



Margarida de Sousa
Mineiro Serra Nabiça

Scaffolds Preparados por Sol-Gel para Aplicações
Biomédicas



**Margarida de Sousa
Mineiro Serra Nabiça**

**Scaffolds Preparados por Sol-Gel para Aplicações
Biomédicas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Materiais, realizada sob a orientação científica da Doutora Isabel Margarida Miranda Salgado, Professora associada e co-orientação da Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes, Professora associada do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica (DEMaC) da Universidade de Aveiro.

O júri

Presidente

Prof. Doutor Joaquim Manuel Vieira
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

Vogais

Prof^a. Doutora Maria Margarida Tavares Lopes de Almeida
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof^a. Doutora Maria Clara Henriques Baptista Gonçalves
Professora Auxiliar da Universidade Técnica de Lisboa

Prof^a. Doutora Isabel Margarida Miranda Salvado
Professora Associada da Universidade da Aveiro

Prof^a. Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes
Professora Associada da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de expressar um profundo agradecimento às minhas orientadoras, Prof^a. Doutora Isabel Margarida Miranda Salvado e Prof^a. Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes, pela oportunidade do trabalho cedida, pelo apoio, dedicação e ajuda.

Aos colegas do Laboratório, José Carlos Almeida e António Castro, pela permanente disponibilidade e apoio incondicional, pelos conhecimentos que me transmitiram e pelas palavras sempre amigas.

Aos colegas do BioLab, em especial à Erica Davim e à Nathalie Barroca, pelo apoio e disponibilidade, pela ajuda e pelo carinho demonstrado.

Aos Engenheiros Ana, Bruno, Célia, Maria João e Marta do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica por todo o auxílio e disponibilidade prestados.

À Engenheira Celeste Azevedo do Departamento de Química, pela eficiência e rapidez nos pedidos de análise.

Aos meus queridos pais, porque sempre me fizeram acreditar que seria capaz, por respeitaram e apoiarem todas as escolhas ao longo da minha vida e pelo amor incondicional. Sem eles nada seria possível!

Aos meus irmãos, por serem o meu porto de abrigo, pelos conselhos, pelo apoio e pelo inesgotável carinho.

Ao Diogo Bártolo, meu amigo e companheiro, pela paciência, motivação, carinho e amor ao longo deste período.

Aos amigos de sempre, em especial à Marta Carvalhosa, pela imensa amizade, pelo incentivo e pelos momentos de descontração durante todo o meu percurso académico.

A todas as pessoas, que direta ou indiretamente me acompanharam ao longo de todo este período, e que contribuíram para que esta fase fosse concluída.

Palavras-chave

Scaffolds, Biomateriais, Surfactantes, Sol-Gel, Bioatividade

Resumo

O desenvolvimento de suportes porosos tridimensionais (*scaffolds*) com capacidade de interagirem com o organismo levando à formação do novo osso, a uma taxa igual à sua taxa de degradação, tem-se tornado num dos grandes desafios da Engenharia de tecidos.

No presente trabalho desenvolveram-se *scaffolds* para aplicações em regeneração óssea, com vidros dos sistemas $\text{SiO}_2\text{-CaO-TiO}_2$ e $\text{SiO}_2\text{-CaO-ZrO}_2$, produzidos pelo método de sol-gel, utilizando dois tipos de surfactantes (Lauril Sulfato de Sódio e Óxido de Polietileno) como agentes formadores de poros. Estudou-se a influência do tipo e quantidade de surfactante utilizado, a introdução dos alcóxidos de zircônio e de titânio nos *scaffolds* e a bioatividade dos mesmos. O comportamento térmico dos surfactantes foi avaliado por análise térmica diferencial (ATD). Os *scaffolds* foram caracterizados morfologicamente, antes e após imersão em fluido fisiológico simulado (SBF), através de microscopia eletrônica de varrimento (SEM) e as áreas superficiais específicas dos *scaffolds* foram determinadas pelo método de adsorção física de gás de azoto (BET). A análise de espectroscopia de emissão por plasma induzido acoplado (ICP) foi realizada a fim de avaliar o comportamento bioativo dos *scaffolds*, bem como a sua dissolução em SBF.

A utilização de um surfactante não iônico (PEO) como agente formador de poros, permitiu produzir *scaffolds* com características morfológicas mais interessantes que as dos produzidos com a introdução de um surfactante aniônico (SLS). Os primeiros exibiram uma rede de macroporos homogênea e interligada, com macroporos de maiores dimensões ($>50\mu\text{m}$), bem como valores de áreas superficiais mais elevados ($262\text{m}^2/\text{g}$). Verificou-se ainda que os *scaffolds* do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-ZrO}_2$ apresentaram valores significativamente maiores de áreas superficiais do que os *scaffolds* produzidos a partir do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-TiO}_2$, exibindo por isso, uma maior capacidade de formação da camada apatítica.

Os testes de bioatividade revelaram que todos os *scaffolds* apresentaram a formação de uma camada de fosfato de cálcio na sua superfície, assim como uma taxa de degradação constante, mostrando assim o elevado potencial destes materiais para aplicação no campo da regeneração óssea.

Keywords

Scaffolds, Biomaterials, Surfactants, Sol-Gel, Bioactivity

Abstract

The development of three-dimensional porous structures (scaffolds) with ability to interact with the body leading to the formation of new bone at a rate equal to its own rate of degradation, has become a major challenge in tissue engineering.

In the present study the scaffolds for bone regeneration applications were developed, within the glass systems $\text{SiO}_2\text{-CaO-TiO}_2$ and $\text{SiO}_2\text{-CaO-ZrO}_2$ produced by sol-gel method using two types of surfactants (sodium lauryl sulphate, SLS, and polyethylene oxide, PEO) as pore-forming agents. The study was focused on the influence of the type and amount of surfactant used, the introduction of alkoxides of zirconium and titanium and the bioactivity of the scaffolds. The thermal behavior of surfactants was evaluated by differential thermal analysis (DTA). The scaffolds were characterized morphologically, before and after immersion in simulated body fluid (SBF), using scanning electron microscopy (SEM) and specific surface area of scaffolds were determined by physical adsorption of nitrogen gas (BET). The analysis by emission spectroscopy induced coupled plasma (ICP) was carried out to evaluate the performance of the bioactive scaffolds and their dissolution in SBF.

The use of a nonionic surfactant (PEO) as a pore-forming agent, allowed the production of scaffolds with morphological characteristics more interesting than the ones produced by the introduction of an anionic surfactant (SLS). The former showed a homogeneous network of macropores interconnected and with larger macropores ($> 50\mu\text{m}$) as well as higher values of surface area ($262\text{m}^2/\text{g}$). In addition, it was also found that the scaffolds of the system $\text{SiO}_2\text{-CaO-ZrO}_2$ showed significantly greater surface areas than the scaffolds produced from the system $\text{SiO}_2\text{-CaO-TiO}_2$, showing therefore a greater ability to interact with the surrounding medium and form an apatitic layer.

The bioactivity tests showed that all scaffolds exhibited the formation of a layer of calcium phosphate on their surface, and a constant degradation rate, thus showing the high potential of applying these materials in the field of bone regeneration.

Índice

Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	vi
Lista de Símbolos e Abreviaturas	vii
Capítulo I	1
1. Introdução	3
1.1. Motivação	3
1.2. Objetivos	4
Capítulo II	5
2. Revisão da Bibliografia	7
2.1. Engenharia de tecidos	7
2.2. Tecido ósseo	9
2.2.1. Composição e estrutura do tecido ósseo	9
2.3. <i>Scaffolds</i>	11
2.3.1. Biocompatibilidade	12
2.3.2. Morfologia	12
2.3.3. Características da superfície	13
2.3.4. Biodegradabilidade e propriedades mecânicas	14
2.4. Materiais para produção de <i>Scaffolds</i>	14
2.4.1. Vidros bioativos	16
2.5. Técnicas de produção de <i>Scaffolds</i>	19
2.5.1. Processo Sol-Gel	20
Capítulo III	35
3. Procedimento experimental	37

3.1.	Materiais e reagentes	37
3.2.	Preparação das estruturas precursoras	38
3.3.	Preparação dos <i>Scaffolds</i>	41
3.4.	Técnicas de caracterização	44
3.4.1.	Área superficial Específica (BET)	44
3.4.2.	Análise Térmica Diferencial e Termogravimétrica (ATD/TG)	46
3.4.3.	Difração de Raio-X (DRX)	46
3.4.4.	Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)	46
3.4.5.	Espectroscopia de Infravermelhos (FTIR)	47
3.5.	Ensaio de Bioatividade <i>In Vitro</i>	47
Capítulo IV		51
4.	Resultados e discussão	53
4.1.	Caracterização das estruturas precursoras	53
4.2.	Caracterização dos <i>Scaffolds</i>	59
4.2.1.	Método S	59
4.2.2.	Método P	70
4.3.	Ensaio de bioatividade	80
4.3.1.	Análise das modificações da superfície	80
4.3.2.	Análise da variação na concentração iónica da solução	87
Capítulo V		91
5.	Conclusões e trabalhos futuros	93
Bibliografia		97

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação do método de regeneração <i>in vitro</i>	8
Figura 2 - Representação da estrutura do osso cortical e do osso trabecular.	9
Figura 3 - Imagens de microtomografia de raio-X de (a) <i>scaffold</i> de vidro bioativo produzido por Sol-Gel e (b) osso trabecular do fêmur humano. Retirado de [15].	13
Figura 4 - Representação estrutural de compostos de sílica com a mesma composição sendo (a) uma estrutura cristalina e (b) um vidro. Adaptado de [62].	15
Figura 5 - Difractograma de raio-X da hidroxiapatite e de um vidro de composição 80% SiO ₂ – 4% P ₂ O ₅ – 16 % CaO em % molar. Adaptado do artigo [62].	16
Figura 6 - Ilustração do processo de secagem do gel. Adaptado de [68].	24
Figura 7 - Ilustração da estrutura das moléculas de surfactante na forma livre e posterior ocorrência da auto-organização: A – cabeça hidrofílica e B – cauda hidrofóbica. Retirado de [87].	28
Figura 8 - Ilustração das possíveis formas de estruturas organizadas, a: micela esférica normal, b: micela esférica invertida, c: lamelar e d: vesículo. Retirado de [90].	28
Figura 9 - Estrutura molecular do Lauril Sulfato de Sódio (SLS).	29
Figura 10 - Esquema das etapas que conduz uma suspensão micelar, de micelas esféricas, a um material de sílica mesoporoso. Adaptado de [1].	31
Figura 11 - Estrutura do óxido de polietileno.	32
Figura 12 - Esquema do mecanismo de formação de meso e macroestruturas com adição de um surfactante não-iônico. Adaptado de [98].	33
Figura 13 - Esquema do processo sol-gel com a introdução de um surfactante.	34
Figura 14 - Esquema ilustrativo do processo sol-gel para a produção das estruturas nos sistemas SiO ₂ -CaO-MO ₂ (M=Zr ou Ti).	40
Figura 15 - Ilustração esquemática do processo sol-gel para a produção dos <i>scaffolds</i>	43
Figura 16 - Classificação das isotérmicas de adsorção segundo a IUPAC.	44
Figura 17 - Classificação dos ciclos de histerese segundo a IUPAC.	45
Figura 18 - Micrografias das amostras TiO e ZrO tratadas a 400 °C e 700 °C.	53
Figura 19 - Isotérmicas de Adsorção/Dessorção das amostras TiO e ZrO tratadas a (a) 400 °C e (b) 700 °C.	54

Figura 20 - Distribuição do tamanho de poros das amostras Ti0 tratadas a 700 °C e a 400 °C.....	56
Figura 21 - Difratoograma de raio-X das amostras Ti0 e Zr0 tratadas a 400 °C e 700 °C.	56
Figura 22 - Espectros de infravermelhos das amostras Ti0 (a) e Zr0 (b) tratadas a 700 °C e a 400 °C.	58
Figura 23 - Micrografias dos <i>scaffolds</i> ZrS1 e TiS1 tratados a 700 °C com diferentes ampliações.	59
Figura 24 - Micrografias dos <i>scaffolds</i> ZrS2 e TiS2 tratados a 400 °C e a 700 °C.....	60
Figura 25- Isotérmicas de Adsorção/Dessorção (a) e distribuição do tamanho de poros (b) dos <i>scaffolds</i> ZrS1 e ZrS2 tratados a 700 °C.	62
Figura 26 - Isotérmicas de Adsorção/Dessorção (a) e distribuição do tamanho de poros (b) dos <i>scaffolds</i> TiS1 e TiS2 tratados a 700 °C.....	62
Figura 27 - ATD/TG do <i>scaffold</i> ZrS2 a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.....	65
Figura 28 - Difratoograma de raio-X dos <i>scaffolds</i> ZrS1, ZrS2, TiS1 e TiS2 tratados a 700 °C.....	66
Figura 29 - Micrografias do <i>scaffold</i> TiS2 tratado a 700 °C ao fim de 7 horas de imersão em SBF.	67
Figura 30 - Gráficos de EDS do <i>scaffold</i> TiS2 tratado a 700 °C ao fim de 7 horas de imersão em SBF.	67
Figura 31 - Espectros de infravermelhos dos <i>scaffolds</i> ZrS1 e ZrS2 (a) e TiS1 eTiS2 (b) tratados a 700 °C.	69
Figura 32 - Micrografias dos <i>scaffolds</i> ZrP1, ZrP2, TiP1 e TiP2 tratados a 400 °C.....	71
Figura 33 - Micrografias dos <i>scaffolds</i> ZrP2 e TiP2 tratados a 700 °C.....	71
Figura 34 - Isotérmicas de Adsorção/Dessorção e distribuição do tamanho de poros dos <i>scaffolds</i> ZrP1 e ZrP2 tratados a 400 °C.	73
Figura 35 - Isotérmicas de Adsorção/Dessorção e distribuição do tamanho de poros dos <i>scaffolds</i> TiP1 e TiP2 tartados a 400 °C.....	73
Figura 36 - Monolíticos obtidos pelo método P de (a) zircónia-ZrP2 e de (b) titânia-TiP2.	76
Figura 37 - ATD/TG do <i>scaffold</i> ZrP2 a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.....	77

Figura 38 - Difratoograma de raio-X dos <i>scaffolds</i> ZrP1, ZrP2, TiP1 e TiP2 tratados a 400 °C.....	77
Figura 39 - Espectros de infravermelhos dos <i>scaffolds</i> ZrP1 e ZrP2 (a) e TiP1 e TiP2 (b) tratados a 400 °C.	79
Figura 40 - Micrografias das amostras Zr0 e Ti0 tratadas a 400 °C ao fim de diferentes tempos de imersão em SBF.	82
Figura 41 - Gráficos de EDS das amostras (a) Zr0 e (b) Ti0 ao fim de 7 dias de imersão em SBF.	82
Figura 42 - Micrografias dos <i>scaffolds</i> ZrS2 e TiS2 tratados a 700 °C ao fim de diferentes tempos de imersão em SBF.	83
Figura 43 - Gráficos de EDS dos <i>scaffolds</i> (a) ZrS2 e (b) TiS2 ao fim de 7 dias de imersão em SBF.	83
Figura 44 - Micrografias dos <i>scaffolds</i> ZrP2 e TiP2 tratados a 400 °C ao fim de diferentes tempos de imersão em SBF.	84
Figura 45 - Gráficos de EDS dos <i>scaffolds</i> (a) ZrP2 e (b) TiP2 ao fim de 7 dias de imersão em SBF.	84
Figura 46 - Difratoograma de raio-X d do <i>scaffold</i> ZrP2 tratado a 400 °C, após 14 dias de imersão em SBF.	85
Figura 47 - Espectro de infravermelhos do <i>scaffolds</i> ZrP2 tratado a 400 °C, após 14 dias de imersão em SBF.....	86
Figura 48 - Concentrações iônicas de (a) Ca e de (b) P em função do tempo de imersão em SBF, das amostras Zr0 e Ti0.....	88
Figura 49 - Concentrações iônicas de (a) Ca e de (b) P em função do tempo de imersão em SBF, dos <i>scaffolds</i> ZrS2 e TiS2.....	88
Figura 50 - Concentrações iônicas de (a) Ca e de (b) P em função do tempo de imersão em SBF, dos <i>scaffolds</i> ZrP2 e TiP2.....	89

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Propriedades mecânicas e porosidade do osso cortical e do osso esponjoso. Adaptado da referência [35].	10
Tabela 2 - Número de coordenação e grau de insaturação de alguns metais tetravalentes (Z=4).....	21
Tabela 3 - Descrição dos materiais e reagentes utilizados, bem como a respetiva fórmula química e pureza.....	38
Tabela 4 - Condições experimentais utilizadas na preparação das soluções precursoras dos sistemas $\text{SiO}_2\text{-CaO-MO}_2$ (M=Zr ou Ti).	39
Tabela 5 - Condições experimentais utilizadas durante a preparação dos <i>scaffolds</i> dos sistemas $\text{SiO}_2\text{-CaO-MO}_2$ (M=Zr ou Ti).....	42
Tabela 6 - Ordem de adição e quantidade de reagentes na preparação de SBF.	48
Tabela 7 - Concentrações iónicas, mMol l^{-1} , do SBF e do plasma humano.	48
Tabela 8 - Atribuição das bandas de adsorção de infravermelhos correspondentes às amostras Zr0 e Ti0 (figura 22) tratadas a 400 °C e 700 °C.	58
Tabela 9 - Características dos <i>scaffolds</i> ZrS1 e TiS1 tratados a 400 °C e dos <i>scaffolds</i> ZrS2 e TiS2 tratados a 400 °C e a 700 °C.	64
Tabela 10 - Atribuição das bandas de adsorção de infravermelhos correspondentes aos <i>scaffolds</i> ZrS1 e ZrS2 (figura 31a), TiS1 e TiS2 (figura 31b) tratados a 700 °C.....	69
Tabela 11 - Características dos <i>scaffolds</i> ZrP1 e TiP1 tratados a 400 °C e dos <i>scaffolds</i> ZrP2 e TiP2 tratados a 400 °C e a 700 °C.	75
Tabela 12 - Atribuição das bandas de adsorção de infravermelhos correspondentes aos <i>scaffolds</i> ZrP1 e ZrP2 (figura 39a), TiP1 e TiP2 (figura 39b) tratados a 400 °C.....	80
Tabela 13 - Atribuição das bandas de adsorção do infravermelho correspondente ao <i>scaffolds</i> ZrP2 (figura 47), tratado a 400 °C, após 14 dias de imersão em SBF.	87

Lista de Símbolos e Abreviaturas

Símbolo/ Abreviatura	Descrição
ATD	Análise Térmica Diferencial
BET	Isotérmica de Braunaver-Emmett-Teller
DRX	Difração de Raio-X
FTIR	Espetroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier
Hap	Hidroxiapatite Sintética
ICP	Plasma de Acoplamento Induzido
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JCPDS/ICDD	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards/ International Centre for Diffraction Data</i>
N	Número de Coordenação
PEO	Óxido de Polietileno
S_a	Área de Superfície Aparente de Amostra
S_{BET}	Área Superficial Específica
SBF	Solução Simulado do Plasma Humano
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

SEM	Microscopia Eletrônica de Varrimento
SLS	Lauril Sulfato de Sódio
SLES	Lauril Éter Sulfato de Sódio
TCP	Fosfato Tricálcico
TEOS	Tetraetilortosilicato
TG	Análise Termogravimétrica
T_g	Temperatura de Transição Vítrea
T.T.	Tratamento Térmico
U.A.	Unidade Arbitraria
V_s	Volume de SBF
Z	Estado de Oxidação do Metal

Capítulo I

1. Introdução

1.1. Motivação

Nas últimas décadas, a crescente esperança média de vida nos países desenvolvidos, tem incentivado o uso de biomateriais com aplicações nas patologias ósseas ^[1]. A engenharia de tecidos emergiu como uma abordagem promissora para a reparação e regeneração de tecidos e órgãos danificados (em particular nos tecidos ósseos), como resultado de doenças, lesões ou envelhecimento ^[2].

O osso tem a capacidade de se auto regenerar quando o defeito ósseo é pequeno, mas quando o defeito ósseo atinge determinadas dimensões, o osso necessita de suportes que estimulem os mecanismos de regeneração, auxiliando os processos de cura natural. Esses suportes são denominados *scaffolds* ^[3]. Um *scaffold* é uma estrutura porosa que, idealmente deve orientar a formação de novos tecidos, fornecendo uma matriz com porosidade interligada e uma química de superfície adaptada para o crescimento e proliferação celular, assim como para o transporte de nutrientes e resíduos metabólicos ^[2]. Para que um *scaffold* possa ser considerado um material ideal de regeneração óssea, é necessário que apresente alguns requisitos tais como a biocompatibilidade, a bioatividade, a capacidade de substituir temporariamente a função mecânica do osso danificado bem como uma taxa de degradação controlada ^[4].

Durante as ultimas décadas, os vidros bioativos têm fornecido soluções para diferentes defeitos ósseos e para o tratamento de tecidos ^[1]. Estes vidros apresentam alta biocompatibilidade e efeitos biológicos positivos dos seus produtos de reação após implantação, pois, além de não provocarem nenhuma resposta inflamatória ou tóxica, quando ligados ao osso não formam tecidos fibrosos em volta dele ^[5]. Estes vidros bioativos apresentam a capacidade de formar uma camada de fosfato de cálcio (principal constituinte inorgânico do osso) na sua superfície, permitindo assim uma boa ligação ao tecido circundante. Além disso, estimulam o crescimento e proliferação das células ósseas, o que os torna materiais atrativos para serem usados como *scaffolds* ^[6]. O primeiro vidro bioativo foi desenvolvido por *Hench*, em 1971. Foi produzido pelo

processo convencional de fusão e vazamento, com a composição molar de 46,1% SiO₂, 24,4% Na₂O, 26,9% CaO e 2,6% P₂O₅, e foi denominado Bioglass® [3].

No início dos anos 90, foram preparados pela primeira vez, vidros bioativos pelo processo sol-gel [1]. Este é um método simples, e fornece uma nova abordagem para a produção de vidros bioativos, comparando com processo convencional de fusão e vazamento, pois é realizado a temperaturas mais baixas, além de permitir um controle mais fácil da composição e uma melhor homogeneidade química do produto [7]. Além disso, e devido à sua elevada área superficial e porosidade inerente ao processo sol-gel, estes vidros bioativos apresentam altas taxas de ligação ao tecido hospedeiro juntamente com excelentes propriedades de degradação/reabsorção [1].

As propriedades da sílica têm sido bastante estudadas por vários autores devido à sua vasta gama de utilização. Misturas de óxidos com sílica, nomeadamente nos sistemas SiO₂-ZrO₂ e SiO₂-TiO₂, preparadas através do processo sol-gel, têm revelado um grande interesse devido às combinações de propriedades que proporcionam [8]. Estes sistemas combinam as características do elemento formador do vidro com a estabilidade térmica, química e mecânica oferecida pelos óxidos de titânio e zircónio [8-11].

Nos últimos anos, a adição de surfactantes no processo sol-gel tem permitido obter uma porosidade controlada nos biomateriais, criando estruturas tridimensionais com nano e macroporosidade, com potencial aplicação na medicina regenerativa.

1.2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho consiste em desenvolver *scaffolds* para aplicações em engenharia de tecidos, com vidros dos sistemas SiO₂-CaO-TiO₂ e SiO₂-CaO-ZrO₂, produzidos pelo método de sol-gel, sendo a porosidade controlada através do uso de surfactantes. Os objetivos específicos deste trabalho dividem-se em três partes: (i) o estudo do efeito do tipo e quantidade de surfactantes, (ii) a influência da adição do ZrO₂ e do TiO₂ nos *scaffolds* produzidos com surfactantes e (iii) a caracterização do tipo de porosidade e das características da reatividade superficial.

Capítulo II

2. Revisão da Bibliografia

2.1. Engenharia de tecidos

Aumentar a esperança média de vida, assim como manter a qualidade de vida em pessoas doentes e idosas, é um dos grandes desafios do século XXI. Os procedimentos clínicos realizados atualmente, que se baseiam na remoção do tecido danificado e a sua substituição por enxertos (transplantes ou implantes), apresentam como principal objetivo repor todas ou algumas das funcionalidades perdidas ^[12,13]. Os autoenxertos, que são uma porção óssea retirada do próprio paciente, são o padrão de preferência, pois apresentam características necessárias para a regeneração óssea como a capacidade de promover a atividade osteogénica ^[14]. No entanto, a oferta limitada e o risco de complicações, incluindo infeção e dor crónica no sítio dador, são problemas significativos ^[2,14-19]. Devido á oferta limitada do osso dador disponível do próprio paciente para defeitos ósseos grandes, por vezes é necessário a utilização de extensores ósseos, como os aloenxertos (porção óssea retirada de cadáveres ou animais) ou enxertos ossos sintéticos ^[14-19]. Os aloenxertos são portanto uma alternativa aos autoenxertos, mas além de serem caros, tem potenciais riscos, como transmissão de doenças e respostas imunes adversas para o recetor ^[2,14]. Os enxertos ósseos sintéticos existem disponíveis no mercado em grande número, mas apenas 10% são utilizados em procedimentos clínicos ^[15]. Estes enxertos sintéticos são geralmente próteses metálicas e/ou cerâmicas (maioritariamente fosfato de cálcio), mas que apesar das suas vantagens, apresentam grandes limitações como a baixa capacidade de integração com o tecido, no caso dos metais, e a grande fragilidade no caso dos cerâmicos ^[14,20].

Ainda que se tenha em conta toda a evolução no campo da medicina, as alternativas apresentadas, além de oferecerem algumas limitações, como já citado, não possuem três das características mais críticas dos tecidos vivos: capacidade de auto regeneração, a habilidade para manter o fornecimento de sangue, e a capacidade de modificar a sua estrutura em resposta aos fatores ambientais circundantes, como a carga mecânica ^[6]. A engenharia de tecidos é, portanto, uma nova estratégia para produzir biomateriais que

correspondam as características exigidas, estimulando assim os processos de cura natural do osso e servindo de suporte à formação do novo tecido ^[12].

Em 1993, *Lange's* e *Vacanti* ^[citado por 13,21], mencionaram, pela primeira vez, o conceito de Engenharia de tecidos como sendo um dos campos da medicina regenerativa, e definiram-na como "um campo multidisciplinar de investigação que inclui os princípios das ciências biomédicas para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem ou regenerem, mantenham e melhorem a função do tecido perdido ou danificado". Este princípio baseia-se na utilização de células estaminais e de suportes produzidos com biomateriais, denominados de *scaffolds*, que conduzem à formação do novo tecido. Para a engenharia de tecidos, as células estaminais são as células mais utilizadas, pois apresentam uma grande capacidade de proliferação e podem diferenciar-se em vários tipos de células ^[22].

Os métodos utilizados pela engenharia de tecidos podem ocorrer em dois ambientes distintos: *in vitro* ou *in vivo* ^[23]. O primeiro método, consiste em retirar células estaminais do paciente, depositá-las num *scaffold* num ambiente controlado e propício à proliferação celular e, posteriormente à regeneração, colocar o implante no paciente (Figura 1).

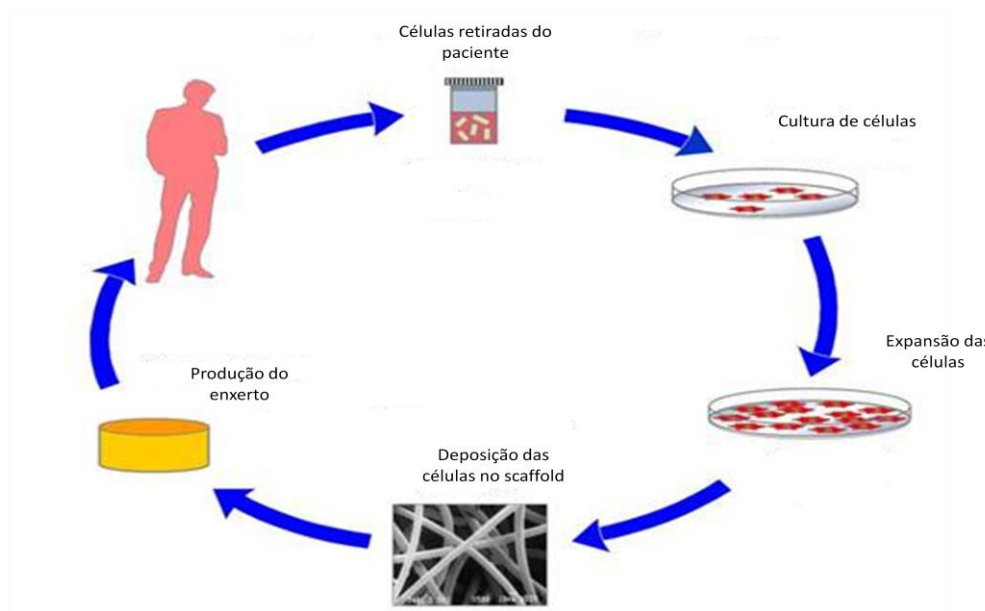


Figura 1 - Representação do método de regeneração *in vitro*.

Adaptado de <http://engbiotec.wordpress.com/2012/09/20/voce-ja-ouviu-falar-em-engenharia-de-tecidos/>.

No método *in vivo*, a regeneração realiza-se após a implantação do *scaffold* no paciente, geralmente com fatores de crescimento e sem células, utilizando a capacidade de regeneração do corpo ^[24].

2.2. Tecido ósseo

Do ponto de vista da engenharia de tecido, é fundamental estudar as funções do tecido ósseo, a sua estrutura e as suas propriedades, por forma a compreender o processo de remodelação e regeneração óssea e assim desenvolver *scaffolds* com as características físicas, químicas e mecânicas adequadas ^[25].

2.2.1. Composição e estrutura do tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo, auto-reparador e capaz de adaptar a sua massa, forma e propriedades às mudanças mecânicas e metabólicas ^[26]. Desempenha algumas funções importantes no nosso corpo como a de suporte dos músculos e proteção dos órgãos internos, e serve como reservatório de minerais ^[27]. Apresenta uma arquitetura complexa, constituída por duas macroestruturas: o osso cortical denso também referido como osso compacto, e o osso trabecular também denominado por osso esponjoso ^[3]. As diferentes macroestruturas estão representadas na Figura 2.

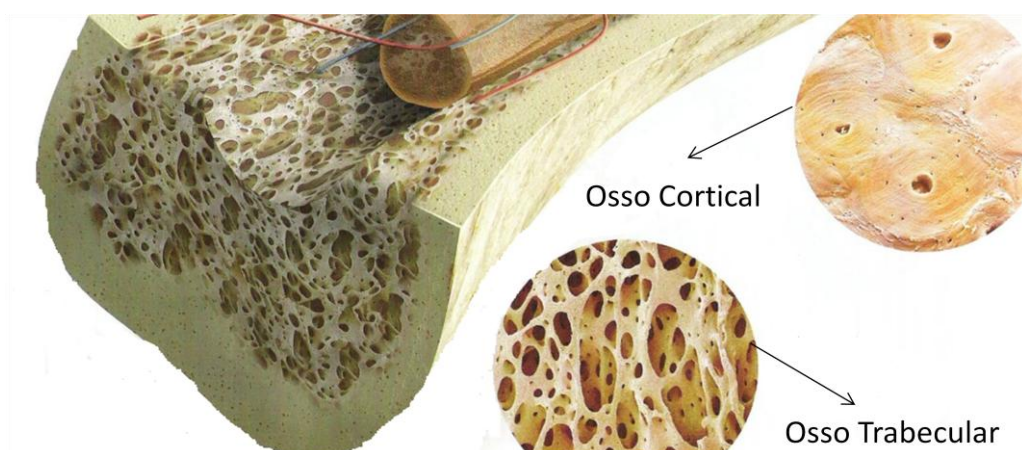


Figura 2 - Representação da estrutura do osso cortical e do osso trabecular.

Adaptado de <http://jes.mine.nu/hueso-compacto-y-esponjoso/>.

O osso cortical é um tecido denso, bem vascularizado e mineralizado, apresentando uma porosidade de 5-10%, e representa cerca de 80% da massa do esqueleto de um humano adulto ^[28]. Apresenta um módulo de elasticidade de 7-30 GPa, um valor de resistência à compressão de 100-230 MPa e uma densidade de 1800-2000 Kg/m³ ^[16,29]. O osso trabecular ocupa os restantes 20 %, possui uma estrutura porosa irregular e interligada com uma porosidade de 50-90% ^[28,30]. Segundo a literatura, o osso trabecular apresenta um módulo de elasticidade de 0,005-0,5 GPa, um valor de resistência à compressão de 2-12 MPa e uma densidade de 1820 Kg/m³ ^[16,29]. As propriedades mecânicas do osso estão representadas na Tabela 1.

Como composto natural, o osso é constituído por uma fase orgânica e uma fase mineral. A fase orgânica (25-30%) consta basicamente de colagénio (polímero natural), que apresenta uma alta resistência à flexão e tração, proporcionando flexibilidade e resistência ^[2,14,22,31]. A fase mineral (65-70%) é constituída por um cerâmico de fosfato de cálcio cristalino, essencialmente a hidroxiapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ ^[32-34], que promove o reforço natural, rigidez e homeostasia mineral, e outras proteínas sem colagénio, para suporte das funções celulares ^[2].

Tabela 1 - Propriedades mecânicas e porosidade do osso cortical e do osso esponjoso. Adaptado da referência [35].

	Resistência à compressão (MPa)	Resistência à flexão (MPa)	Resistência à tração (MPa)	Módulo de elasticidade (GPa)	Porosidade (%)
Osso Cortical	100-230	135-193	50-151	7-30	5-10
Osso Trabecular	2-12	–	1-5	0,005-0.5	50-90

O tecido ósseo é composto por três tipos de células diferentes, responsáveis pela capacidade de auto-regeneração do osso: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. Os osteoblastos são originados pelas células mesenquimais diferenciadas presentes na medula óssea, que se diferenciam em osteoblastos através dos fatores de crescimento ^[22,36]. São as células que concentram o fosfato de cálcio, participando na mineralização

da matriz, sendo desta forma responsáveis pela produção do novo tecido ^[36]. Os osteócitos são considerados como sendo os osteoblastos mais maduros. Estas células já não apresentam capacidade de diferenciação, mas participam na manutenção do tecido ósseo através das trocas metabólicas entre as células e os fluidos orgânicos. As células responsáveis pela degradação do tecido e reabsorção óssea são chamadas osteoclastos ^[26,37].

2.3. *Scaffolds*

Os *scaffolds* são estruturas porosas, produzidas geralmente com o objetivo de simular a estrutura e propriedades do tecido que estão a substituir, servindo como um suporte guia para a formação do novo tecido. Um *scaffold* ideal irá sendo reabsorvido ao longo do tempo, promovendo a regeneração óssea sem que se formem quaisquer zonas fibrosas ou cicatrizes ^[3]. Este suporte necessita de se degradar a uma taxa controlada, ao mesmo tempo que estimula o crescimento de novos tecidos, e apresentar características mecânicas que, permitam suportar a carga enquanto o novo tecido não se desenvolve ^[3,38].

Como material ideal para a regeneração óssea, os *scaffolds* necessitam de cumprir alguns requisitos. Em primeiro lugar, para que possam ser introduzidos no corpo, necessitam de ser biocompatíveis ^[3,39]. Para que o novo tecido ósseo se forme, necessita de apresentar características bioativas. É também essencial que este suporte atue como um modelo tridimensional poroso, ou seja, que possua uma estrutura altamente porosa e uma rede de poros interligada, de modo a mimetizar a estrutura do osso ^[4,40].

Para que o *scaffolds* possa servir de suporte á regeneração óssea, este necessita de possuir propriedades mecânicas semelhantes ás do osso do local de implantação, no mínimo de tempo necessário para que o novo tecido se forme ^[30,41].

Depois de implantado, o *scaffold* necessita de se degradar a uma taxa correspondente á formação do osso, em produtos não tóxicos, que possam ser facilmente reabsorvidos ou excretados pelo corpo ^[30,42].

Tendo em conta a diversidade de formas em defeitos ósseos, os *scaffolds* devem poder ser produzidos por técnicas de processamento que permitam obter uma versatilidade de formas, de modo a encaixarem na geometria dos defeitos ^[3,43]. Para

futuro uso clínico, estas estruturas têm de ser esterilizáveis ^[3,20-21]. Alguns destes requisitos, necessários à produção de um *scaffold*, são de seguida desenvolvidos.

2.3.1. Biocompatibilidade

Um biomaterial quando é implantado está em contato com um determinado tecido vivo ou meio fisiológico, que é de alguma forma agressivo para o material, assim como o próprio biomaterial se torna agressivo para o meio ^[26,44]. Contudo não deve induzir qualquer resposta tóxica, inflamatória ou imune *in vivo*, ou seja, deve ser aceite biologicamente pelo organismo ^[14,45]. Esta característica do material designa-se de biocompatibilidade. O material deve, de facto, manter esta característica não só aquando da sua implantação, mas ao longo de todo o seu período de utilização útil, necessitando para isso que os produtos da sua degradação sejam também biocompatíveis ^[46-48].

2.3.2. Morfologia

A estrutura porosa de um *scaffold* é de grande importância, pois contribui significativamente para o desenvolvimento de funções biológicas específicas tais como a ancoragem e o crescimento das células ^[46-49]. A existência de uma porosidade aberta (> 40-60%), bem como uma microestrutura de poros interligados, ajuda a promover a distribuição uniforme das células, e assegura a sua sobrevivência, migração e proliferação (Figura 3) ^[29,50-51]. É de salientar a importância do grau de porosidade, visto que este influencia também outras propriedades do *scaffold*, como a resistência mecânica, necessária para manter a estabilidade do *scaffold* enquanto o novo tecido não se forma ^[14].

Relativamente ao tamanho de poro, este deve ser suficiente para permitir que as células entrem na estrutura, possibilitando a formação de uma matriz extracelular bem como a vascularização. Se os poros forem pequenos, ocorre uma inclusão dos poros por parte das células, impedindo a penetração das células e consequentemente a formação óssea ^[14].

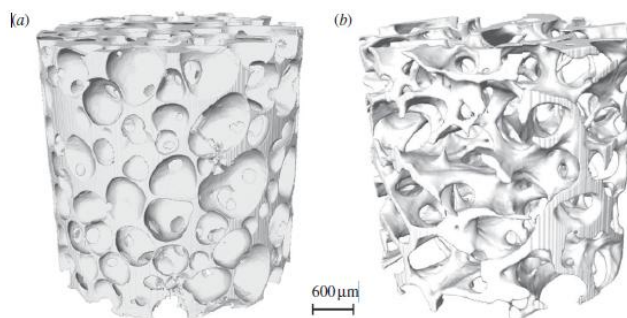


Figura 3 - Imagens de microtomografia de raio-X de (a) *scaffold* de vidro bioativo produzido por Sol-Gel e (b) osso trabecular do fêmur humano. Retirado de [15].

De acordo com a IUPAC, União Internacional de Química Pura e Aplicada, os poros são classificados como micro ou nanoporos quando o seu diâmetro está entre 0,2-2nm, mesoporos entre 2-50nm e macroporos quando apresentam um diâmetro superior a 50nm [52].

A microestrutura do *scaffold*, deve então, ser constituída por macroporos que permitam a entrada e crescimento de células, a saída dos produtos da degradação e circulação sanguínea, e microporos que permitem a adesão local e passagem de nutrientes [12].

É também conveniente que estas estruturas possuam uma área superficial específica elevada para que as células possam ficar acomodadas dentro do *scaffold*, ajudando desta forma a uma melhor regeneração do tecido ósseo [50].

2.3.3. Características da superfície

As propriedades químicas e topográficas de superfície, podem controlar e afetar a adesão celular e a proliferação [14]. As propriedades químicas estão diretamente relacionadas com a capacidade do material de formar, na sua superfície de contato, ligações de natureza química entre o próprio material e o tecido circundante. Esta capacidade por parte dos biomateriais designa-se por bioatividade. A bioatividade classifica-se de acordo com a velocidade de desenvolvimento da ligação interfacial, assim como pela sua força de ligação e espessura da camada formada [53-54]. No que diz respeito aos materiais utilizados para implantes ósseos, estes designam-se por bioativos

se apresentarem a capacidade de depositarem espontaneamente fosfato de cálcio na sua superfície, o que pode ser detetado *in vivo* ou *in vitro*, quando imersos em soluções fisiológicas semelhantes ao plasma humano, e mantidos em condições de temperatura e pH próximas das existentes no corpo humano ^[6].

As propriedades topográficas têm influência na osteocondutividade dos *scaffolds*. Uma superfície mais rugosa terá mais capacidade de apressar a matriz que se está a formar do que uma superfície lisa, e consequentemente facilitar o transporte das células ósseas para a superfície do material ^[55-56].

2.3.4. Biodegradabilidade e propriedades mecânicas

Biodegradabilidade é definida como a capacidade de um material se degradar através das interações com o organismo (reações químicas com o plasma) ou substâncias dele derivadas (enzimas) ^[57]. Esta degradação é necessária para que o novo tecido que se está a formar possa penetrar o *scaffold*, e deste modo concluir a formação do novo tecido ^[58-59].

Os *scaffolds* devem possuir propriedades mecânicas semelhantes às do osso hospedeiro. Devem ser capazes de manter os espaços necessários ao crescimento da matriz e das células, e simultaneamente suportar as pressões hidrostáticas, *in vitro*, bem como as pressões *in vivo* ^[14].

A velocidade de degradação *in vivo* deve corresponder o mais aproximadamente possível à velocidade de regeneração do tecido ósseo, para o que o material mantenha a resistência e estabilidade durante todo o processo de regeneração ^[60-61].

2.4. Materiais para produção de *Scaffolds*

Nas últimas décadas, a medicina tem vindo a usar uma larga gama de materiais para fazer face às patologias do organismo humano ^[36]. No entanto, apenas alguns destes materiais podem ser utilizados para produzir substitutos ósseos, especialmente quando sujeitos a cargas elevadas. A seleção de um biomaterial para utilização clínica baseia-se, principalmente, nas propriedades mecânicas e biológicas ^[36]. Dos materiais utilizados

para a produção de *scaffolds* destacam-se os polímeros naturais ou sintéticos e os cerâmicos, dentro dos quais os vidros e os vitrocerâmicos.

Os polímeros biodegradáveis são usados para produzir suportes para formação óssea, devido ao facto de possuírem algumas vantagens como a sua considerável versatilidade de composições e a capacidade de incorporar e libertar fármacos ^[22]. No entanto, e ao contrário dos materiais cerâmicos, não reproduzem a parte mineral do osso, e como tal não são bioativos.

Os cerâmicos, como a hidroxiapatite sintética (HAp) e o fosfato tricálcico (TCP), têm sido largamente usados, pois apresentem uma composição que mimetiza a fase mineral do osso. Esta composição permite-lhes a criação de uma forte ligação ao osso e adesão às células, possibilitando deste modo a reparação óssea. Apesar de possuírem esta característica essencial, apresentam uma taxa de degradação muito lenta após a implantação ^[22].

Na gama dos materiais cerâmicos, os vidros que são materiais sólidos amorfos, são encontrados na extremidade oposta, no que diz respeito à sua estrutura, relativamente aos cerâmicos, que são materiais sólidos cristalinos ^[62]. Na figura 4 são representadas esquematicamente as diferenças nas estruturas de um material cristalino e de um amorfo, e na figura 5 os difractogramas de raio-X, de um cerâmico (hidroxiapatite) e de um vidro (80%SiO₂ – 4% P₂O₅ – 16 % CaO em % molar) respetivamente.

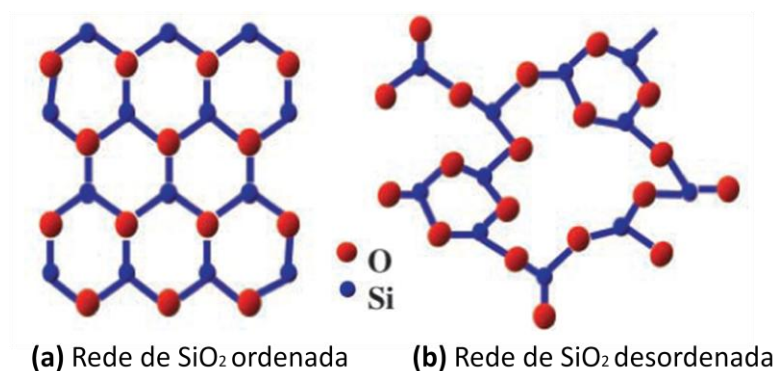


Figura 4 - Representação estrutural de compostos de sílica com a mesma composição sendo (a) uma estrutura cristalina e (b) um vidro. Adaptado de [62].

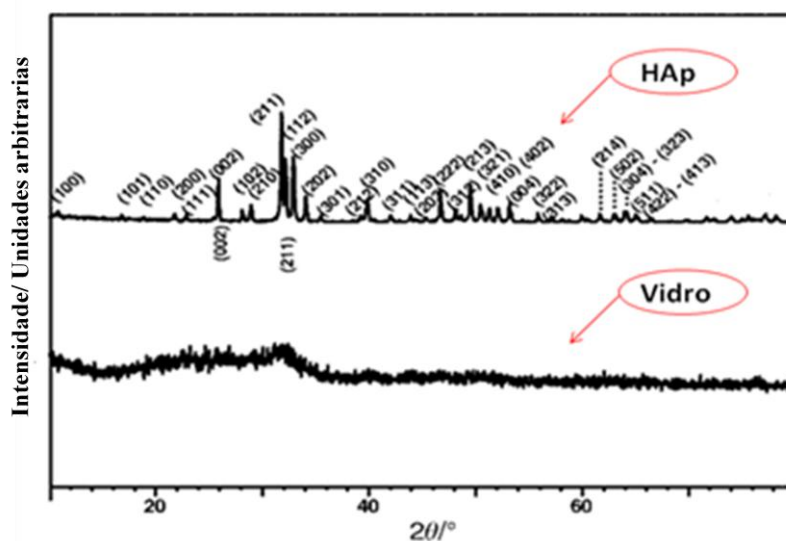


Figura 5 - Difractograma de raio-X da hidroxiapatite e de um vidro de composição 80%SiO₂ – 4% P₂O₅ – 16 % CaO em % molar. Adaptado do artigo [62].

Os vidros bioativos apresentam-se como uma interessante alternativa pois, comparativamente com os cerâmicos, possuem uma taxa de degradação superior e ligam-se ao osso mais rapidamente, apresentando potencial para serem mais bioativos do que os materiais sintéticos à base de fosfato de cálcio ^[15]. De todos os materiais utilizáveis no fabrico de *scaffolds*, serão abordados com mais pormenor os vidros, objeto de estudo desta tese.

2.4.1. Vidros bioativos

O primeiro vidro bioativo que lançou o campo dos cerâmicos bioativos, foi desenvolvido por *Larry Hench* em 1969. Foi produzido pelo método convencional de fusão e vazamento, com a composição molar 46,1% de SiO₂, 26,9% de CaO, 24,4% de Na₂O, e 2,6% de P₂O₅ e foi denominado Bioglass® 45S5 ^[2,63-64]. Desde a sua descoberta que este material tem sido frequentemente considerado como material para produzir *scaffolds* para regeneração óssea. Estes vidros têm uma grande capacidade para estimular o crescimento das células ósseas e para formarem uma forte ligação ao osso ^[63]. Depois de implantados, sofrem reações específicas levando à formação, na sua superfície, de uma camada de fosfato de cálcio amorfo ou de uma fase cristalina de

hidroxiapatite, que é responsável pela forte ligação ao tecido circundante ^[20,30]. Algumas vantagens bastante atrativas destes vidros são a facilidade de controlar a composição química e consequentemente a taxa de degradação ^[63-64]. As estruturas destes vidros podem ser adaptadas a uma ampla gama, através da mudança da temperatura de processamento, composição ou meio, dando origem a novos materiais como os vitrocerâmicos, cerâmicos e outros fosfatos de cálcio sintéticos ^[30].

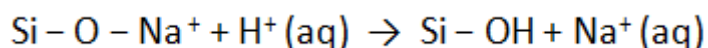
O vidro bioativo 45S5 tem sido usado desde 1985, em mais de um milhão de pacientes, para reparação de defeitos ósseos, nomeadamente em dentária e ortopedia.

Em 1993, foi lançado o PerioGlass® (agora designado de NovaBone Products, Alachu, FL), como enxerto ósseo sintético para reparar defeitos que resultavam de doenças dentais. Este produto é produzido em forma de partículas micrométricas, e é utilizado como regenerador dental junto da raiz ^[63]. O maior sucesso comercial é o NovaMin® (GlaxoSmithKline, UK), um reparador ativo colocado nas pastas de dentes, para mineralizar buracos muito pequenos nos dentes, reduzindo a sensibilidade ^[15].

Como citado acima, os vidros bioativos formam uma forte ligação ao osso, através da formação de uma camada de hidroxiapatite na sua superfície. Quando imersos em fluidos fisiológicos, estes vidros sofrem reações de degradação, libertando iões de cálcio, fosforo e sílica solúvel, que vão estimular a atividade dos osteoblastos, promovendo a formação do osso ^[15]. *Hench* e colaboradores ^[citado por 65] propuseram um mecanismo para a mineralização de apatite constituído por cinco etapas (reações de carácter inorgânico), estabelecido com base nos estudos realizados com biovidros da série *Bioglass*®: ^[63]

(i) *Estágio 1*

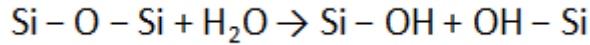
Rápida troca de catiões Na^+ , Ca^{2+} e/ou PO_4^{3-} da superfície do vidro com H^+ ou H_3O^+ da solução, criando ligações de silanol (Si-HO) na superfície do vidro:



O pH da solução aumenta, e uma região rica em sílica forma-se na superfície do vidro. Esta etapa é habitualmente controlado por difusão.

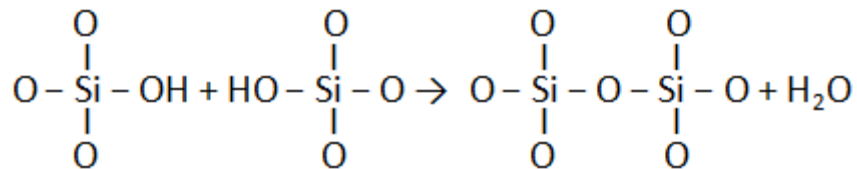
(ii) *Estágio 2*

O valor de pH elevado faz com os radicais OH^- quebrem as ligações Si-O-Si, libertando sílica solúvel $\text{Si}(\text{OH})_4$ na solução, formando mais grupos Si-OH (grupos silanol):



(iii) *Estágio 3*

Grande concentração de grupos silanol na solução, que vão sofrer reações de policondensação para formar a camada rica em sílica na superfície.



(iv) *Estágio 4*

A concentração dos grupos Ca^{2+} e PO_4^{3-} aumenta na solução com o tempo, pois ocorre a libertação de íons da rede vítrea e posteriormente forma-se um filme amorfo rico em $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ na superfície do vidro.

(v) *Estágio 5*

A camada de fosfato de cálcio amorfo começa a incorporar aniões OH^- e CO_3^{2-} da solução, e cristaliza para formar hidroxiapatite.

Dependendo da composição inicial do vidro e do número de ligações iniciais de Si-O-Si disponíveis, os cinco estágios podem ocorrer relativamente rápido, desde poucas horas a alguns dias ^[15]. Após a mineralização ocorre a ligação às células progenitoras do osso, a diferenciação celular, a formação de fibras de colagénio por parte do osso e a excreção da matriz extracelular ^[63].

Para produzir *scaffolds* de vidro bioativo, é necessário realizar-se um processo de sinterização, com o objetivo de ligar as partículas numa fase de vidro, contendo uma rede de poros interligada ^[15]. Uma das complicações deste vidro está diretamente

relacionada com o aumento de temperatura no processo de sinterização ^[63]. O vidro estará, portanto, sujeito a temperaturas superiores à temperatura de transição vítrea (T_g), levando à formação de uma fase cristalina, que influencia a taxa de degradação do vidro, e consequentemente a sua bioatividade ^[66]. A composição binária 70S30C (percentagem molar de 70%SiO₂ e 30%CaO) tem mostrado ser mais propícia para produzir *scaffolds* tridimensionais de vidro bioativo, através do processo Sol-Gel, indicando bioatividade melhorada ^[66].

No entanto, os *scaffolds* de vidro bioativo para aplicações biomédicas, apresentam ainda uma grande limitação: baixa resistência mecânica, sendo apenas indicados para defeitos que apresentem baixas cargas ^[30].

2.5. Técnicas de produção de *Scaffolds*

Para produzir *scaffolds* de vidro bioativo, podem ser utilizados dois métodos de processamento: o processo convencional de fusão e vazamento e o processo sol-gel. No método convencional, os óxidos são misturados e fundido a altas temperaturas ^[3]. Este é um processo que apresenta algumas limitações, essencialmente relacionadas com as altas temperaturas de sinterização, que provocam densificação do vidro e formação de uma fase cristalina. Em alternativa, para produzir *scaffolds* de vidros para regeneração óssea, é realizado o processo sol-gel, um método químico, que utiliza baixas temperaturas de processamento. Os vidros sol-gel foram desenvolvidos por *Li et. al.* ^[citado por 6], com o objetivo de aumentar a taxa de degradação e bioatividade. O resultado foram vidros com taxas de degradação mais elevadas, e consecutivamente, um aumento da bioatividade e melhor ligação ao osso ^[3].

No processo sol-gel os reagentes são misturados quimicamente, ao nível molecular, numa solução com baixa viscosidade e a baixas temperaturas, permitindo assim obter materiais mais homogêneos, mantendo a pureza dos componentes precursores.

No método convencional de fusão e vazamento torna-se extremamente difícil preparar materiais com teores de óxidos refratários, pois as altas temperaturas, estes componentes evaporam. Contrariamente a este, pelo processo sol-gel torna viável preparar materiais com estes óxidos, pois as temperaturas de processamento são baixas, evitando deste modo a volatilidade dos componentes. Outra das vantagens do processo

sol-gel é a possibilidade de alterar a estrutura dos materiais controlando as reações do processo, sem que seja necessário introduzir ou retirar algum dos elementos da composição ^[67]. A nanoporosidade inerente ao próprio processo, que consequentemente aumenta a área superficial, são de alta importância quando se trata de produzir suportes de regeneração óssea ^[63].

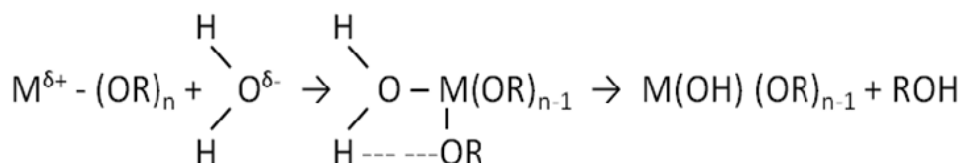
2.5.1. Processo Sol-Gel

O processo sol-gel engloba dois métodos distintos para preparar soluções: o método coloidal, que consiste na preparação de suspensões de partículas finas coloidais, e o método dos alcóxidos que se caracteriza pelas reações de hidrólise e condensação de alcóxidos metálicos. O método dos alcóxidos foi o método utilizado nesta dissertação, e será descrito em seguida ^[68-69].

A utilização de alcóxidos metálicos para produzir materiais, traduz-se numa elevada reatividade dos reagentes com a água, resultando em reações rápidas de hidrólise e condensação. Após tais reações, forma-se uma rede de macromoléculas onde as unidades estruturais são espécies $M(OR)_n$, em que M representa o elemento metálico (Si, Ti ou Zr, nesta dissertação), R o grupo alquilo e O o oxigénio. Esta rede será posteriormente transformada nos óxidos correspondentes aos alcóxidos utilizados ^[68-69].

2.5.1.1. Hidrólise

O processo inicia-se com as reações de hidrólise de precursores alcóxidos. Esta reação é caracterizada pelo ataque nucleofílico do oxigénio da água ao átomo metálico, ocorrendo posteriormente a substituição dos grupos OR por grupos OH⁻, criando grupos hidroxilos reativos (M-OH), como demonstra a reação seguinte ^[15]:



Ao sofrerem o ataque nucleofílico dos grupos OH^- , os átomos do metal vão aumentar o número de coordenação no estado de transição. Esta reatividade química que os alcóxidos possuem depende da capacidade do átomo de metal de aumentar o seu número de coordenação. Na tabela 2 podem-se observar os valores do número de coordenação (N) e o grau de insaturação (N-Z) dos metais tetravalentes utilizados nesta dissertação ^[68].

Tabela 2 - Número de coordenação e grau de insaturação de alguns metais tetravalentes (Z=4).

Alcóxidos	N	(N-Z)
Si(OPz)ⁱ₄	4	0
Ti(OPz)ⁱ₄	6	2
Zr(OPz)ⁱ₄	7	3

O grau de insaturação traduz-se pela diferença do número de coordenação (N) e do estado de oxidação do metal (Z). Este parâmetro é o parâmetro mais importante na determinação da reatividade química dos alcóxidos. Observando a tabela verifica-se que à medida que o número de coordenação aumente, o grau de insaturação dos alcóxidos aumenta ^[68-69].

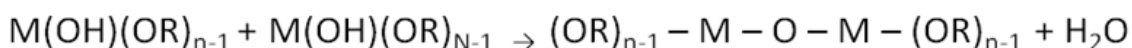
Os alcóxidos de titânio e de zircónio, apresentam uma reatividade muito mais alta do que a reatividade do silício, podendo desta forma ocorrer precipitação dos óxidos. Para produzir sistemas de mistura homogénea de óxidos, como é o caso dos sistemas utilizados nesta dissertação, em que se usam alcóxidos com diferentes reatividades, é aconselhável que se recorra a um passo de pré-hidrólise dos alcóxidos com reatividades baixas ^[52].

2.5.1.2. Condensação

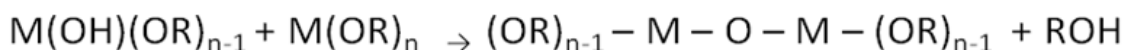
Posteriormente à reação de hidrólise ocorrem as reações de condensação, onde os polímeros formados se recombinaem para criar estruturas ramificadas que ocupam todo o volume anteriormente ocupado pelo sol. Estes polímeros condensam, até atingirem um tamanho macroscópico, formando uma rede sólida contínua, denominada de gel ^[68].

Esta etapa de condensação pode ocorrer por dois mecanismos distintos, dependendo das condições experimentais: a oxalação e a olação.

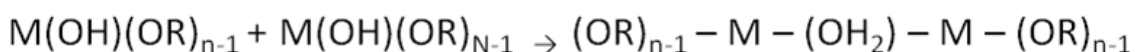
A oxalação é uma reação onde ocorre uma substituição nucleofílica por eliminação de água ou de um grupo álcool, resultando na formação de pontes de hidrogénios entre um átomo de oxigénio e dois centros metálicos. Quando a razão estequiométrica H_2O/M é muito superior a 2, o processo resulta na formação de água como demonstra a seguinte equação:



Quando a razão estequiométrica H_2O/M é inferior a 2, o processo de condensação favorece a formação de um álcool, conforme afigura a equação seguinte ^[68]:



A olação é uma reação onde ocorre a adição nucleofílica que resulta na formação de pontes de hidrogénio entre um hidroxilo (OH) e dois centros metálicos. Esta reação ocorre devido ao facto do centro metálico não apresentar um grau de insaturação satisfatório ($N-Z > 0$). A equação seguinte ilustra o processo de olação:



Posteriormente à reação de oxalação ou olação, os polímeros ligam-se, reorganizam-se e condensam formando o gel, no interior do qual ficam retidos os solventes, os produtos da reação e os polímeros não ligados ^[68].

O facto de alguns alcóxidos possuírem baixa reatividade influencia diretamente a velocidade das reações (hidrolise e condensação), que são geralmente aceleradas com a adição de catalisadores ácidos ou básicos. Para o caso do alcóxido de sílica, precursor utilizado neste trabalho, é necessária a adição de catalisadores ácidos ou básicos para que se aumentem as velocidades das reações, visto que estes possuem um grau de insaturação baixo. Em condições ácidas, a solução está enriquecida com iões H^+ e o

ataque nucleofílico é realizado pela água, resultando na formação de grupos silanol neutros (Si-OH) e protonados (Si-OH_2^+). Estes grupos encontram-se nos extremos das cadeias onde a condensação vai ocorrer preferencialmente, resultando na formação de polímeros lineares. Em condições básicas, prevalecem na solução iões OH^- e o ataque nucleofílico será realizado pelos grupos silanol desprotonados (Si-O^-). Nestas condições a condensação é favorecida nas espécies presentes no meio da cadeia, o que resulta na formação de polímeros mais ramificados ^[68-69].

Neste estudo, devido à posterior adição de um alcóxido extremamente reativo, realizou-se um primeiro passo de hidrólise em meio ácido para evitar a precipitação do alcóxido mais reativo.

2.5.1.3. Secagem e densificação

Segue-se o processo de secagem, onde são removidos os solventes existentes no interior dos poros, para que se obtenha um gel seco. Este processo inicia-se com a evaporação do líquido, onde o vapor atravessa o gel até a superfície, causando pressão capilar entre as fases gasosa e líquida. Posteriormente ocorre uma retração considerável de rede do gel (deformação da rede), que provoca a sua rigidez impedindo a relaxação da estrutura. Ao mesmo tempo que a pressão capilar aumenta, a velocidade de deformação da rede também aumenta, fazendo com que a superfície do gel retraia mais que as camadas internas. Isto é, quando a velocidade de evaporação é elevada, a redistribuição do líquido no gel é dificultada e as regiões do gel que estão mais secas contraem e ficam em tração. Todas estas tensões que surgem são consequência do processo, necessitando o mesmo de ser bem controlado para que não ocorra fragmentação dos geles ^[63,70-71].

Para que a fragmentação se evite, e se consigam obter blocos monolíticos, poderá recorrer-se a alguns processos: aumento do tempo de envelhecimento ou adição de produtos químicos. Quando um gel é sujeito a períodos de envelhecimento longos, a rede formada fortalece, permitindo desta forma alguma retração até que o gel seja suficientemente denso para suportar o desenvolvimento de tensões ^[68]. Ao adicionar-se um aditivo químico, como os agentes surfactantes, ocorre uma diminuição da tensão capilar e consequente diminuição das tensões de deformação.

Na figura 6 é ilustrado o processo de secagem do gel.

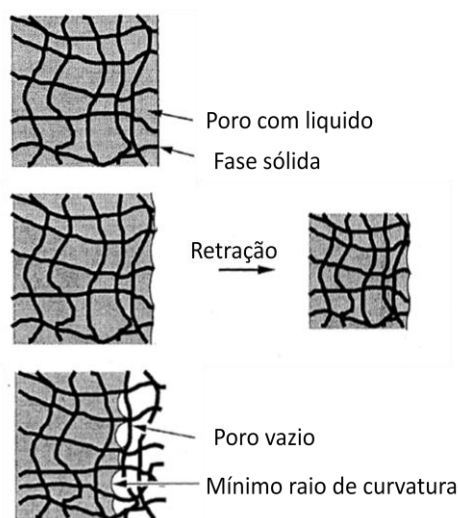


Figura 6 - Ilustração do processo de secagem do gel. Adaptado de [68].

Como etapa final no processo sol-gel, e para que se possa obter um vidro a partir de um gel, realiza-se a densificação. Este processo caracteriza-se por um aumento de temperatura (geralmente entre os 600 e 700 °C), que provoca uma eliminação progressiva de poros, assim como a remoção de orgânicos e de grupos OR e OH. Os grupos Si-OH da superfície condensam para formar ligações Si-O-Si. Ao mesmo tempo que ocorre um relaxamento da estrutura, dá-se a reestruturação e rearranjo das ligações, e consecutiva diminuição de volume [68-69].

2.5.1.4. Sistemas SiO₂-TiO₂ e SiO₂-ZrO₂

A combinação de propriedades proporcionadas pela mistura de óxidos com sílica no processo sol-gel, nomeadamente nos sistemas SiO₂-ZrO₂ e SiO₂-TiO₂, têm revelado um crescente interesse [8]. A produção de estruturas nos sistemas SiO₂-ZrO₂ e SiO₂-TiO₂ combinam as características do elemento formador do vidro com a estabilidade térmica, química e mecânica oferecida pelos óxidos de titânio e zircónio [8-11]. De facto, quando falamos de suportes para aplicações biomédicas, a elevada área superficial associada a uma elevada porosidade, bem como a estabilidade química e mecânica são pontos cruciais.

Rodríguez Avendaño *et al.* ^[8], prepararam materiais nos sistemas SiO₂-ZrO₂ e SiO₂-TiO₂, pelo método sol-gel, que foram posteriormente tratados termicamente. Os autores mostraram que, esta mistura de óxidos apresentou uma isotérmica do tipo I, indicando a existência de microporos. Para as amostras no sistema SiO₂-ZrO₂ os autores observaram uma área superficial de 481 m².g⁻¹ e um diâmetro de poro de na gama dos mesoporos (4nm).

Estudos anteriores demonstraram que, a incorporação da titânia em vidros influenciam o comportamento dos vidros em termos biológicos, exibindo bioatividades em ensaios realizados *in vitro*. Quando estes materiais são imersos em soluções fisiológicas, formam grupos Ti-OH que apresentam um efeito catalítico na nucleação da apatite ^[72-74]. Além disto, mostrou-se que a incorporação do óxido de titânio, no sistema SiO₂-CaO-TiO₂, melhora as propriedades mecânicas dos materiais, aumentando o módulo de Young ^[75]. Qi Chen, *et al.* ^[75], prepararam híbridos no sistema Polidimetilsiloxano (PDMS)-CaO-SiO₂-TiO₂ pelo método de sol-gel, e obtiveram materiais exibindo valores de módulo de Young semelhantes aos do osso humano, e formação de uma camada de apatite na sua superfície, quando imersos em fluido fisiológico. Wei *et al.* ^[76], prepararam geles de titânia com a incorporação de diferentes quantidades de CaO com o objetivo de estudar a sua bioatividade. Verificaram que os geles com titânia formaram uma camada de apatite, contrariamente aos geles que continham apenas CaO, que não apresentaram a formação de qualquer camada.

Dias *et al.* ^[77] prepararam materiais vitro-cerâmicos no sistema 45% CaO · 37% P₂O₅ · 5% MgO · 13% TiO₂ e verificaram que este materiais apresentavam uma boa taxa de degradação, apresentando desta forma um elevado potencial para aplicações em suportes para regeneração óssea.

Wu *et al.* ^[78], produziram estruturas mesoporosas de titânia pelo processo sol-gel para aplicações biomédicas. Os autores sintetizaram as estruturas através de hidrólise controlada do óxido de titânio em etanol. As nanopartículas apresentaram um diâmetro médio de 354 nm, uma área superficial específica de 237,3 m².g⁻¹ e um tamanho poro de cerca de 2,8 nm. Testes de viabilidade celular em cultura de células mostraram que as estruturas apresentaram biocompatibilidade. Além disso, foi demonstrado também que estes suportes poderiam ser bons candidatos para plataformas de liberação controlada de fármacos pela sua facilidade de funcionalização.

Vários estudos têm demonstrado assim, que a mistura homogênea dos óxidos SiO_2 e TiO_2 combinam as propriedades mecânicas do silício com as propriedades químicas do titânio, assim como a adição de pequenas quantidades de titânia à sílica confere a estes materiais uma elevada estabilidade térmica ^[79].

A introdução do óxido de zircônio no silício tem mostrado particular interesse devido a propriedades como a alta dureza, elevada resistência química, elevada resistência ao desgaste e biocompatibilidade ^[80,81]. Em alguns estudos mostrou-se também que a incorporação do óxido de zircônio em alguns materiais promove o aumento das propriedades biológicas. Comparando vidros do sistema binário Ca-Si, os vidros produzidos no mesmo sistema mas com a incorporação de ZrO_2 exibiram uma excelente capacidade de suportar a adesão e proliferação das células ósseas ^[81]. Além disso, este óxido eleva consideravelmente a resistência química dos materiais num amplo intervalo de pH, nomeadamente na zona alcalina.

Yufang Zhu *et al.* ^[81], produziram *scaffolds* de vidro bioativo com diferentes teores de zircônia, utilizando espumas de poliuretano. Os resultados mostraram que a introdução de ZrO_2 aumentou a resistência à compressão e melhorou a adesão e proliferação das células, mantendo um pH mais estável. A área superficial específica revelou valores entre 200-350 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$, o diâmetro médio de poro foi de 3-4,5 nm e todos os *scaffolds* formaram na sua superfície uma camada de fosfato de cálcio após imersão em SBF. No entanto verificou-se que tanto para a área superficial como para a bioatividade, os valores diminuía à medida que a concentração de zircônia aumentava.

Alfaya *et al.* ^[82], prepararam misturas de óxidos SiO_2 - ZrO_2 pelo método de sol-gel com uma variedade de composições, mostrando que os materiais obtidos apresentaram uma elevada área superficial entre os 400 e 650 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ e um volume de poro entre 0,29 e 0,38 $\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$. Do mesmo modo, mas usando dois precursores de zircônia diferentes, López *et al.* ^[83], prepararam a mesma mistura de óxidos, onde as amostras obtidas apresentaram uma área superficial superior a 500 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ após densificação a 800 °C.

Lencastre *et al.* ^[84] e Marques *et al.* ^[85], produziram materiais híbridos Polidimetilsiloxano (PDMS)-CaO- SiO_2 - ZrO_2 com a incorporação do propóxido de zircônio, pelo método sol-gel. Os materiais obtidos mostraram que a adição de propóxido de zircônio interfere diretamente na estabilidade térmica, assim como na bioatividade dos materiais. De acordo com os testes de bioatividade realizados, a

precipitação da apatite foi favorecida pela adição de propóxido de zircónio e pelo tratamento térmico. As micrografias de SEM mostraram que a deposição de uma camada de hidroxiapatite mais abundante e homogénea se encontra em materiais preparados com propóxido de zircónio e com posterior tratamento térmico.

2.5.1.5. Utilização de surfactantes

Os surfactantes, também designados de tensioativos, são compostos anfifílicos visto possuírem uma estrutura constituída por duas partes distintas: uma parte hidrofóbica (apolar) que não é solúvel em água, e outra parte hidrofílica (polar) solúvel em água ^[86]. Estes compostos são caracterizados pela capacidade de diminuir a energia superficial, surgindo assim a origem da palavra surfactante da expressão em inglês “*Surface active agent*”. A energia livre por unidade de área é denominado tensão superficial e corresponde à quantidade de trabalho necessário para expandir a interface ^[87].

Quando um surfactante é adicionado à água, as suas moléculas tendem a se auto organizar de modo a promoverem uma separação entre os grupos hidrofóbicos e a água. Os grupos polares do surfactante permanecem na suspensão aquosa, próximo da superfície, e os grupos apolares ficam na interface água-ar, minimizando o contacto com a água. Este processo gera uma diminuição da tensão superficial da água, pois provoca um desarranjo na superfície ^[88,89].

A parte hidrofóbica e a parte hidrofílica formam uma molécula designada por unímero, constituída por uma “cauda” e por uma “cabeça”, respetivamente (Figura 7). A “cauda” é composta por uma ou mais cadeias hidrocarbonadas contendo geralmente um número de átomos de carbono que varia entre 6 a 18, e o seu tamanho e grau de saturação podem variar consideravelmente ^[87]. A natureza da “cabeça” apresenta uma determinada densidade de carga que vai definir o tipo de surfactante. Existem três tipos de surfactantes: aniónicos, catiónicos e não-iónicos. Nesta tese, apenas se estudaram surfactantes aniónicos e não-iónicos, visto serem os mais referenciados na literatura.

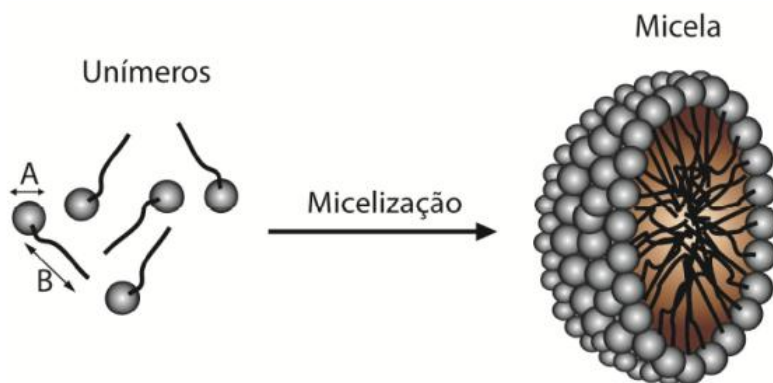


Figura 7 - Ilustração da estrutura das moléculas de surfactante na forma livre e posterior ocorrência da auto-organização: A – cabeça hidrofílica e B – cauda hidrofóbica. Retirado de [87].

Os unímeros agregam-se, formando estruturas organizadas denominados micelas, em suspensão aquosa, a partir de uma determinada concentração. A concentração mínima para que ocorra a formação de micelas designa-se por concentração crítica micelar ^[86]. O fenómeno de auto-organização ocorre por forma a maximizar o contacto entre os grupos polares e a água e, consequentemente, aumentar a interface entre a parte hidrofóbica e o meio aquoso ^[87]. As estruturas organizadas formadas podem apresentar várias formas, como representa a figura 8, dependendo da estrutura do surfactante e da polaridade do meio em que estão inseridos ^[90].

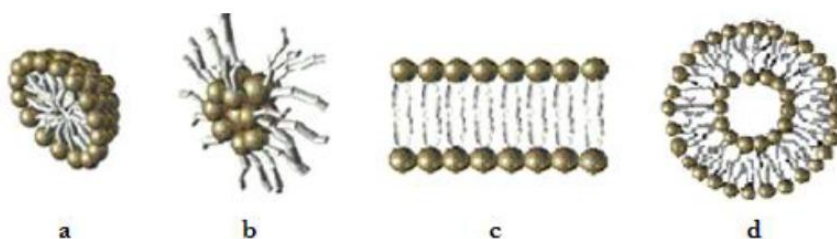


Figura 8 - Ilustração das possíveis formas de estruturas organizadas, **a**: micela esférica normal, **b**: micela esférica invertida, **c**: lamelar e **d**: vesículo. Retirado de [90].

Nos surfactantes aniónicos, os aniões da molécula são a espécie tensoativa. Estes surfactante formam micelas esféricas normais, sendo as interações entre os grupos de

natureza electrostática ^[91]. Dentro destes, os surfactante aniônicos mais utilizados são o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) designado muitas vezes também por Lauril Sulfato de Sódio (SLS). A figura 9 ilustra a estrutura molecular do Lauril Sulfato de Sódio.

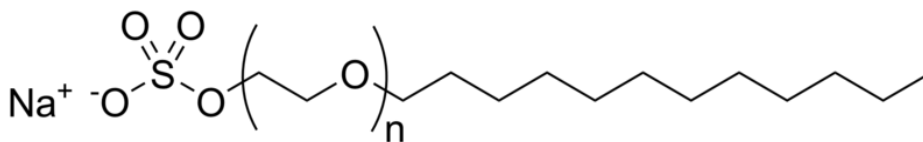


Figura 9 - Estrutura molecular do Lauril Sulfato de Sódio (SLS).

Retirado de <http://www.quimicaonline.net/?p=882>.

No processo sol-gel é incorporado um surfactante na suspensão, após a reação de hidrólise, e posterior agitação vigorosa. Sobre condições apropriadas, os surfactantes aniônicos organizam-se em micelas esféricas, que se ligam aos precursores de sílica hidrolisada, através dos componentes hidrofílicos, e se auto organizam numa fase ordenada (figura 10) ^[1]. Esta fase ordenada depende de alguns fatores como a química do surfactante (aniônico ou não-iônico), o volume de fase orgânica/fase inorgânica, da concentração do surfactante, temperatura e pH ^[86,87,90,91]. Quando ocorre a gelificação, esta fase ordenada (espuma produzida) é “congelada” na estrutura.

Nos últimos anos, o processo sol-gel associado à presença de surfactantes têm sido utilizado no campo dos materiais, permitindo obter porosidade controlada dos vidros bioativos à escala macrométrica ^[63]. Qi-Zhi Chen, *et al.* ^[4] produziram *scaffolds* de biovidro com composições molares de 46,1% de SiO₂, 26,9% de CaO, 24,4% de Na₂O e 2,5% de P₂O₅, introduzindo pela primeira vez neste vidro, surfactantes para criar estruturas tridimensionais altamente porosas. A adição do surfactante foi combinada com uma agitação vigorosa e posterior sinterização a 1000 °C por 2 horas. Verificou-se um aumento significativo nas propriedades mecânicas, assim como uma rápida libertação de iões Na⁺, atribuída à grande área superficial provocada pela utilização de surfactantes ^[4]. Este avanço abriu uma nova geração de vidros bioativos de sol-gel com aplicações em libertação controlada de fármacos, assim como em implantes regenerativos ^[1]. O comportamento bioativo destes vidros foi melhorado, devido aos seus altos valores de porosidade e área superficial, tal como a capacidade para hospedar agentes ativos que contribuem para o processo de regeneração ^[1].

Coelho *et al.* ^[92], produziram *scaffolds* de vidro bioativo no sistema CaO-SiO₂-P₂O₅ utilizando dois tipos de surfactantes, um aniônico (Lauril Éter Sulfato de Sódio (SLES)) e um não-iônico (Tergitol®), com o objetivo de estudar as propriedades da espuma do surfactante durante o processamento e nas estruturas finais. Estas propriedades são geralmente avaliadas através do volume inicial (capacidade de formação de espumas) e a diminuição desse volume com o tempo (estabilidade). Os resultados mostraram que o surfactante aniônico apresentava melhores resultados em termos de volume de espumas e de estabilidade, e que com o aumento da concentração de surfactante aumentava o volume de espumas. Com *scaffolds* produzidos com o surfactante aniônico obtiveram-se matrizes com 90% de porosidade e com um tamanho de macroporo que variou entre 100 e 500 µm. As espumas tratadas a 700 °C apresentaram uma área superficial especificam de 92 m².g⁻¹ e um diâmetro médio de mesoporo de 4,2 nm.

Jones *et al.* ^[93], produziram *scaffolds* de vidro bioativo em três sistemas diferentes (SiO₂, CaO-SiO₂ e CaO-SiO₂-P₂O₅) pelo processo sol-gel, utilizando várias concentrações de um surfactante aniônico (Teepol®). O objetivo destes autores foi o de observar o efeito da composição e da concentração de surfatante nas estruturas finais. Os resultados obtidos mostraram que o sistema CaO-SiO₂ foi o mais suscetível para formar espumas e que à medida que se aumentou a concentração de surfactante, o volume de espumas também aumentou, aumentando consecutivamente a diâmetro de poros assim como a regularidade da forma. O sistema binário mostrou também apresentar um maior tamanho de macroporo (140 µm) comparativamente aos restantes sistemas. Concluíram por fim que a adição de surfactante não afetou a estrutura dos mesoporos.

Mansur *et al.* ^[94], estudaram *scaffolds* híbridos de vidro bioativo/PVA e de vidro bioativo/quitosano/PVA pelo processo sol-gel, utilizando um surfactante aniônico (SLS). Obtiveram estruturas tridimensionais com macroporosidade interligada e com uma rede de poros na escala dos mesoporos. Além disso os híbridos mostraram boas propriedades mecânicas assim como boa viabilidade celular.

Yokoi *et al.* ^[95], produziram estruturas mesoporosas de sílica através do processo sol-gel utilizando um surfactante aniônico (SDS) como agente formador de poros. As estruturas obtidas apresentaram mesoporosidade com um tamanho de poro de cerca de

3,2-3,3 nm e uma área superficial de 274-501 m².g⁻¹. Os resultados mostraram ainda que após a calcinação das estruturas, as mesmas mantiveram intactas e que o tamanho de poro aumentou devido à libertação do surfactante.

Jones *et.al.* [6], prepararam *scaffolds* de vidro no sistema 70S30C, pelo método de sol gel com adição de um surfactante aniônico, com o objetivo de otimizar a força de compressão mantendo a bioatividade e a rede de poros interligada. A resistência mecânica dos vidros tem sido melhorada pelo aumento da temperatura de sinterização. Mostrou-se que a força de compressão aumenta de 0,36 para 2,26 MPa quando as temperaturas são aumentadas de 600 °C para 800 °C, e que este aumento não tem um grande impacto na rede de macroporos interligada. Um aumento da resistência mecânica destes vidros, tem sido atribuída à formação de uma fase cristalina de silicato de cálcio CaSiO₃. Uma das preocupações associadas com os tratamentos térmicos dos vidros bioativos à sua temperatura de cristalização, é a possibilidade de afetar a biodegradabilidade dos *scaffolds* [4].

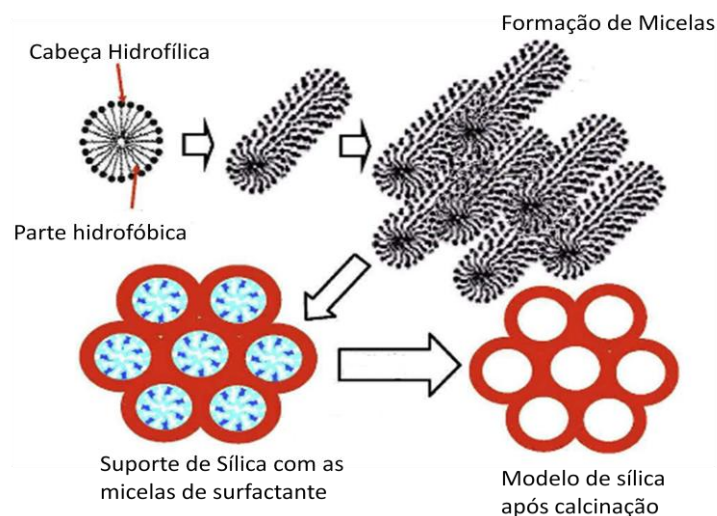


Figura 10 - Esquema das etapas que conduz uma suspensão micelar, de micelas esféricas, a um material de sílica mesoporoso. Adaptado de [1].

Os surfactantes não-iônicos, tal como os surfactantes aniônicos possuem uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica, mas neste tipo de surfactantes a parte hidrofílica não tem iões, sendo constituída por grupos polares, tais como éteres e hidroxilos [85]. Estes

surfactante formam estruturas organizadas do tipo vesiculo, sendo as interações entre os grupos proporcionadas por pontes de hidrogénio. Um exemplo deste tipo de surfactantes é o óxido de polietileno (PEO), um polímero sintético, policristalino, formado por unidades repetidas do etileno. É biodegradável, não toxico e solúvel em água ^[96,97]. A figura 11 esquematiza a estrutura do PEO.

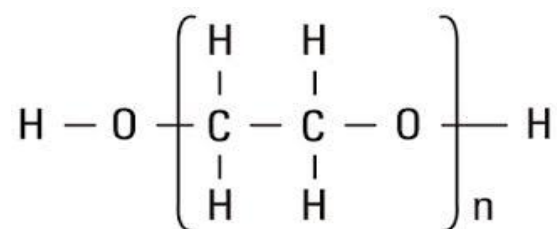


Figura 11 - Estrutura do óxido de polietileno.

Retirado de http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3259234_jpis-41-263-g006&req=4.

Os surfactantes não-iónicos são usados da mesma forma que os surfactantes aniónicos no processo sol-gel, mas a sua forma de atuação é ligeiramente diferente. Após a hidrólise do precursor, o alcóxido metálico hidrolisado é adicionado à suspensão micelar de PEO, resultando numa mesoestrutura com grupos hidroxilos na sua superfície. As moléculas de surfactante são adsorvidas nas superfícies sólidas e agregam-se na interfase sólido/suspensão. Este mecanismo inicia-se com a junção das partes hidrofílicas, e posteriormente, as interações fortes entre as partes hidrofóbicas vão promover a adsorção. Ao contrário dos surfactantes aniónicos, as moléculas dos surfactantes não-iónicos constroem supermicelas na superfície, ao invés de formarem pequenas micelas que se agregam e em seguida são adsorvidas na superfície ^[98]. Como resultado, são obtidos materiais com uma estrutura constituída por meso e macroporos. O esquema que ilustra este mecanismo está representado na figura 12.

Jean-Luc Blin et al. ^[98], produziram materiais de óxidos metálicos, ZrO₂ e TiO₂ meso e macroporosos, utilizando o óxido de polietileno com agente surfactante para criar porosidade. As estruturas formadas apresentaram macroporosidade com macroporos de 300 a 600 nm para as estruturas de óxido de zircónio, e macroporos com dimensões superiores para as estruturas de óxido de titânio. No entanto, os canais de macroporos

formaram-se paralelamente uns aos outros, em forma de “funil” direcionados para o centro da estrutura.

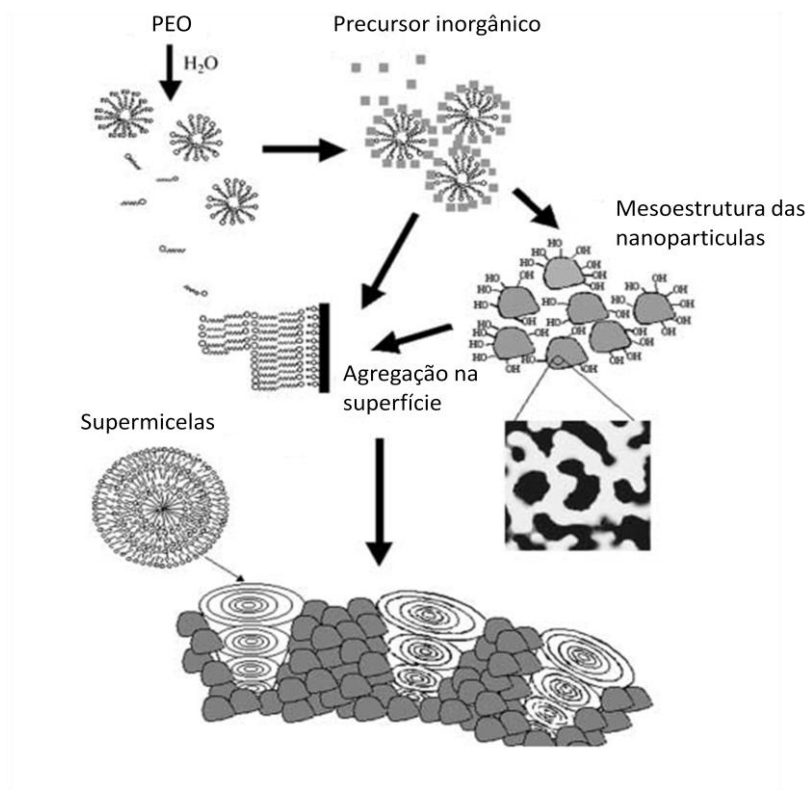


Figura 12 - Esquema do mecanismo de formação de meso e macroestruturas com adição de um surfactante não-iônico. Adaptado de [98].

Marque *et al.* ^[99,100] e Almeida *et al.* ^[101], prepararam scaffolds monolíticos no sistema SiO₂-CaO, pelo processo sol-gel, utilizando como agente formador de poros o PEO. Como resultado obtiveram estruturas com nanoporos (2-25 nm) e macroporos (5-300 µm) interligados.

Zimny *et al.* ^[102], produziram estruturas de titânia mesoporosas com a adição de copolímero de PEO como surfactante, com o objetivo de estudar a influência da concentração de surfactante nas propriedades das estruturas. Os resultados mostraram claramente que quanto menor a concentração do surfactante, melhor e mais ordenada foi a mesoporosidade (de 9,8 nm para 6-9,7 nm). As estruturas mostraram boa estabilidade térmica com maior concentração de TiO₂ e menor concentração de surfactante, obtendo-

se estruturas porosas menos danificadas após tratamento térmico. Após remoção do surfactante a área superficial foi de $370 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.

Durante o processo de densificação, o surfactante é removido por calcinação, obtendo-se uma microestrutura similar à do osso trabecular humano. Essa estrutura é constituída por macroporos interligados, resultantes do processo de formação de espumas, e nanoporos inerentes ao processo sol-gel ^[30]. A figura 15 esquematiza o processo sol-gel com a introdução de um surfactante, para formar um monolítico poroso.

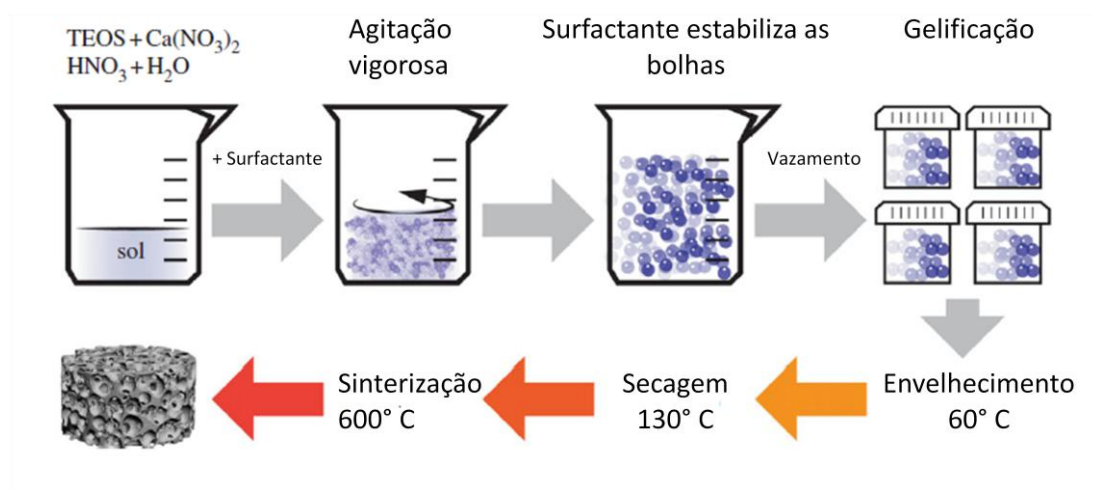


Figura 13 - Esquema do processo sol-gel com a introdução de um surfactante.

Adaptado de [15].

Capítulo III

3. Procedimento experimental

O procedimento experimental iniciou-se com a preparação e caracterização de amostras precursoras nos sistemas $58\%\text{SiO}_2\text{-}23\%\text{CaO-}9\%\text{ZrO}_2$ e $58\%\text{SiO}_2\text{-}23\%\text{CaO-}9\%\text{TiO}_2$, em percentagem molar, pelo processo sol-gel. Como procedimento seguinte, realizou-se a produção de *scaffolds* dos sistemas previamente preparados, com a adição de um surfactante como agente formador de poros. Os primeiros *scaffolds* foram produzidos adicionando, a cada um dos sistemas utilizados, um surfactante aniônico de nome Lauril Sulfato de Sódio (SLS), em diferentes concentrações. Seguidamente produziram-se *scaffolds* com a adição de um surfactante não-iônico, o Óxido de Polietileno (PEO), também em diferentes concentrações. Foram utilizados dois tipos de surfactantes diferentes com o objetivo de estudar o efeito do tipo de surfactante. Todos os *scaffolds* foram posteriormente caracterizados morfologicamente. Para estudar a bioatividade dos *scaffolds*, assim como das amostras precursoras, as amostras foram imersas numa solução fisiológica simulada (SBF) previamente preparada, por diferentes intervalos de tempo. Como passo final, procedeu-se à caracterização de todas as amostras assim como do meio fisiológico utilizado.

De seguida são descritos os materiais e reagentes utilizados assim como os procedimentos experimentais, e apresentadas as varias técnicas de caracterização utilizadas.

3.1. Materiais e reagentes

Para a produção de *scaffolds* utilizaram-se vários reagentes e materiais que foram fornecidos pela empresa *Aldrich*, com exceção do etanol absoluto que foi fornecido pela empresa *Panreac*. Na tabela 3 estão descritos os reagentes e materiais utilizados bem como a sua fórmula química e pureza.

Tabela 3 - Descrição dos materiais e reagentes utilizados, bem como a respetiva fórmula química e pureza.

Reagentes	Fórmula Química	Pureza
Tetraetilortosilicato (TEOS)	$C_8H_{20}O_4Si$	$\geq 99,9\%$
Etanol Absoluto PA	CH_3CH_2OH	99,5%
Ácido Clorídrico	HCL	25%
Isopropóxido de Titânio	$C_{12}H_{28}O_4Ti$	97%
Propóxido de Zircónio	$C_{12}H_{28}O_4Zr$	70% wt - 1 Propanol
Etilacetoacetato	$C_6H_{10}O_3$	-
Ácido Nítrico	HNO_3	64-66%
Nitrato de Cálcio	$CaN_2O_6 \cdot 4H_2O$	$\geq 99,9\%$
Lauril Sulfato de Sódio	$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$	99%
Óxido de Polietileno	$(CH_2-CH_2O)_n$	-
Ácido Acético	$C_2H_4O_2$	$\geq 99,7\%$
Ureia	CH_4N_2O	-

3.2. Preparação das estruturas precursoras

Para preparar as amostras do sistema SiO_2 -CaO- MO_2 (M=Zr ou Ti), utilizou-se o tetraetilortosilicato (TEOS), o nitrato de cálcio, o propóxido de zircónio ou o isopropóxido de titânio. Como primeiro passo realizou-se uma pré-hidrólise da solução de SiO_2 -CaO durante uma hora à temperatura ambiente, uma vez que o TEOS apresenta uma cinética de hidrólise diferente do propóxido de zircónio e do isopropóxido de titânio. Neste primeiro passo foi adicionado ao TEOS o nitrato de cálcio previamente diluído em água, o ácido clorídrico como catalisador e o etanol para promover a miscibilidade TEOS- H_2O . Na tabela 4 estão indicadas as razões molares utilizadas para a preparação das soluções precursoras.

Tabela 4 - Condições experimentais utilizadas na preparação das soluções precursoras dos sistemas $\text{SiO}_2\text{-CaO-MO}_2$ (M=Zr ou Ti).

Composição	Amostra	Razões molares		
		$\text{H}_2\text{O/TEOS}$	HCL/TEOS	EtOH/TEOS
$58\text{SiO}_2\text{-}23\text{CaO-}9\text{ZrO}_2$	Zr0	4,0	0,071	1,222
$58\text{SiO}_2\text{-}23\text{CaO-}9\text{TiO}_2$	Ti0	4,5	0,076	1,223

Para o sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-ZrO}_2$, utilizou-se o ácido nítrico como estabilizador do propóxido de zircônio numa razão molar $\text{HNO}_3/\text{PrZr}=1$. Para o sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-TiO}_2$, foi utilizado o etilacetoacetato como estabilizador, com uma razão molar de $\text{Etacac/iPrTi}=2$. Ambos os estabilizadores foram adicionados a fim de evitar a precipitação dos alcóxidos de zircônio e de titânio.

Após a mistura dos propóxidos de Zr e Ti com os respectivos estabilizadores, a mistura resultante foi adicionado à solução de TEOS parcialmente hidrolisada. Todas as misturas foram realizadas à temperatura ambiente, utilizando um agitador magnético.

As suspensões obtidas foram colocadas em frascos de polipropileno fechados com uma película de polietileno, e posteriormente foram colocados numa estufa a $60\text{ }^\circ\text{C}$, para promover a gelificação. O tempo de gelificação dos sistemas com ZrO_2 foi mais curto do que com os sistemas com TiO_2 . Após obtenção dos geles, estes mantiveram-se na estufa a $60\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 dias com o objetivo de envelhecer os geles.

Todos os geles foram tratados a $150\text{ }^\circ\text{C}$ durante 72 horas, à pressão atmosférica. Como procedimento final, realizaram-se dois tratamentos térmicos diferentes, com o objetivo de estudar a influência das temperaturas nas estruturas obtidas. Metade das amostras de cada sistema foram tratadas a $400\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas, e as restantes metades foram tratadas a $700\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas. Ambos os tratamentos foram realizados a uma taxa de aquecimento constante de $60\text{ }^\circ\text{C/hora}$, com um primeiro patamar aos $250\text{ }^\circ\text{C}$ mantido durante 2 horas, e posteriormente até às temperaturas máximas de tratamento ($400\text{ }^\circ\text{C}$ e $700\text{ }^\circ\text{C}$). Todas as amostras obtidas foram guardadas num exsiccador de sílica-gel até à sua utilização.

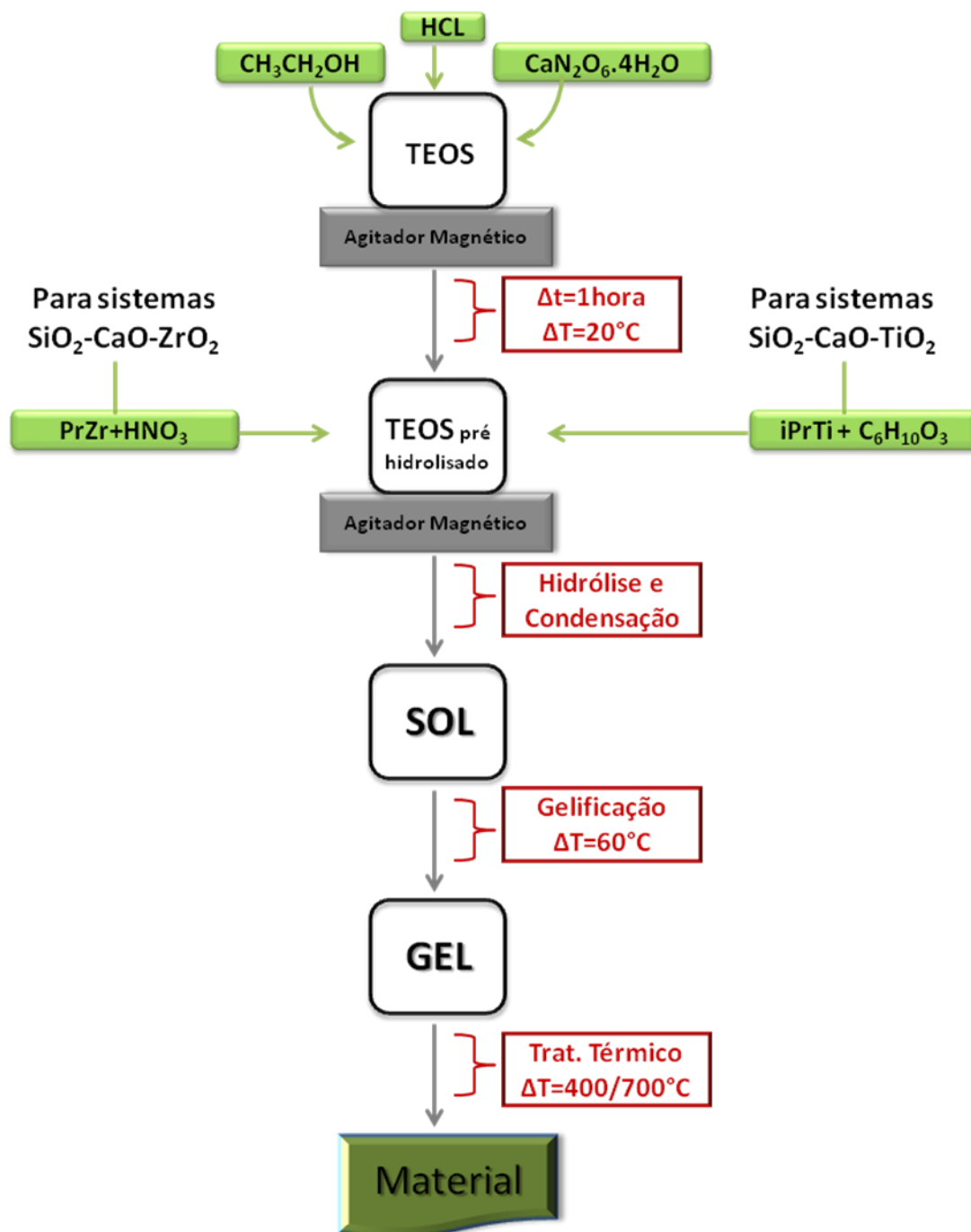


Figura 14 - Esquema ilustrativo do processo sol-gel para a produção das estruturas nos sistemas $\text{SiO}_2\text{-CaO-MO}_2$ (M=Zr ou Ti).

3.3. Preparação dos *Scaffolds*

Para produzir os *scaffolds*, o método sol-gel foi realizado de uma forma idêntica ao descrito para as estruturas precursoras (ponto 3.2 desta tese), com os mesmos reagentes e respectivas razões molares, mas com a introdução de um surfactante como agente formador de poros. Esta introdução foi realizada em alturas distintas do processo consoante o tipo de surfactante utilizado (Figura 15). Para melhor distinção das vias utilizadas no processo e respectivas amostras, os métodos foram denominados de Método S e Método P, para a introdução do SLS e do PEO respetivamente.

No método S, os *scaffolds* ZrS1, ZrS2, TiS1 e TiS2 (tabela 5) foram produzidos pelo processo sol-gel, adicionando o SLS antes do final da hidrólise do TEOS e após a adição dos óxidos metálicos. O SLS foi diluído em água numa razão molar $\text{SLS}/\text{H}_2\text{O}=0.38$, e adicionado à suspensão juntamente com uma agitação vigorosa, para promover a produção de espumas.

No método P, os *scaffolds* ZrP1, ZrP2, TiP1 e TiP2 (tabela 5) foram produzidos pelo processo sol-gel, onde logo após a pré-hidrólise do precursor de sílica, o PEO foi adicionado. Neste método, a ureia (utilizada como expansor de poros) foi introduzida numa razão molar de $\text{Ureia}/\text{TEOS}=0.11$ e 0.12 (para o óxido de titânio e zircónio respetivamente) à solução, juntamente com o etanol e o HCL. O PEO de peso molecular 100,000 foi diluído numa solução aquosa de 20 ml de ácido acético 0,05 N. Posteriormente foi adicionado à suspensão, após 30 minutos do início da hidrólise da sílica e antes da adição dos óxidos metálicos.

Foram utilizadas diferentes concentrações de SLS e de PEO, representadas em razões molares na tabela 5, com o objetivo de estudar o efeito da concentração de surfactante.

Tabela 5 - Condições experimentais utilizadas durante a preparação dos *scaffolds* dos sistemas SiO₂-CaO-MO₂ (M=Zr ou Ti).

Composição	Amostra	Razões molares		
		Zr,Ti/TEOS	SLS/TEOS	PEO/TEOS
58SiO ₂ -23CaO-9ZrO ₂	ZrS1	0,156	0,038	-
	ZrS2	0,156	0,077	-
	ZrP1	0,156	-	0,0168
	ZrP2	0,156	-	0,0204
58SiO ₂ -23CaO-9TiO ₂	TiS1	0,155	0,018	-
	TiS2	0,155	0,036	-
	TiP1	0,155	-	0,0123
	TiP2	0,155	-	0,0157

Para ambos os métodos, após a formação do sol, as amostras foram colocadas em frascos de polipropileno tapados com uma película de polietileno, e foram colocados na estufa a 60 °C. Logo após gelificação as amostras foram sujeitas ao mesmo tratamento térmico que as estruturas precursoras. As temperaturas a que os tratamentos térmicos foram realizados, foram suficientes para ocorrer a calcinação de ambos os surfactantes, obtendo-se os *scaffolds*. As estruturas porosas produzidas foram guardadas numa estufa a 40 °C até posterior utilização.

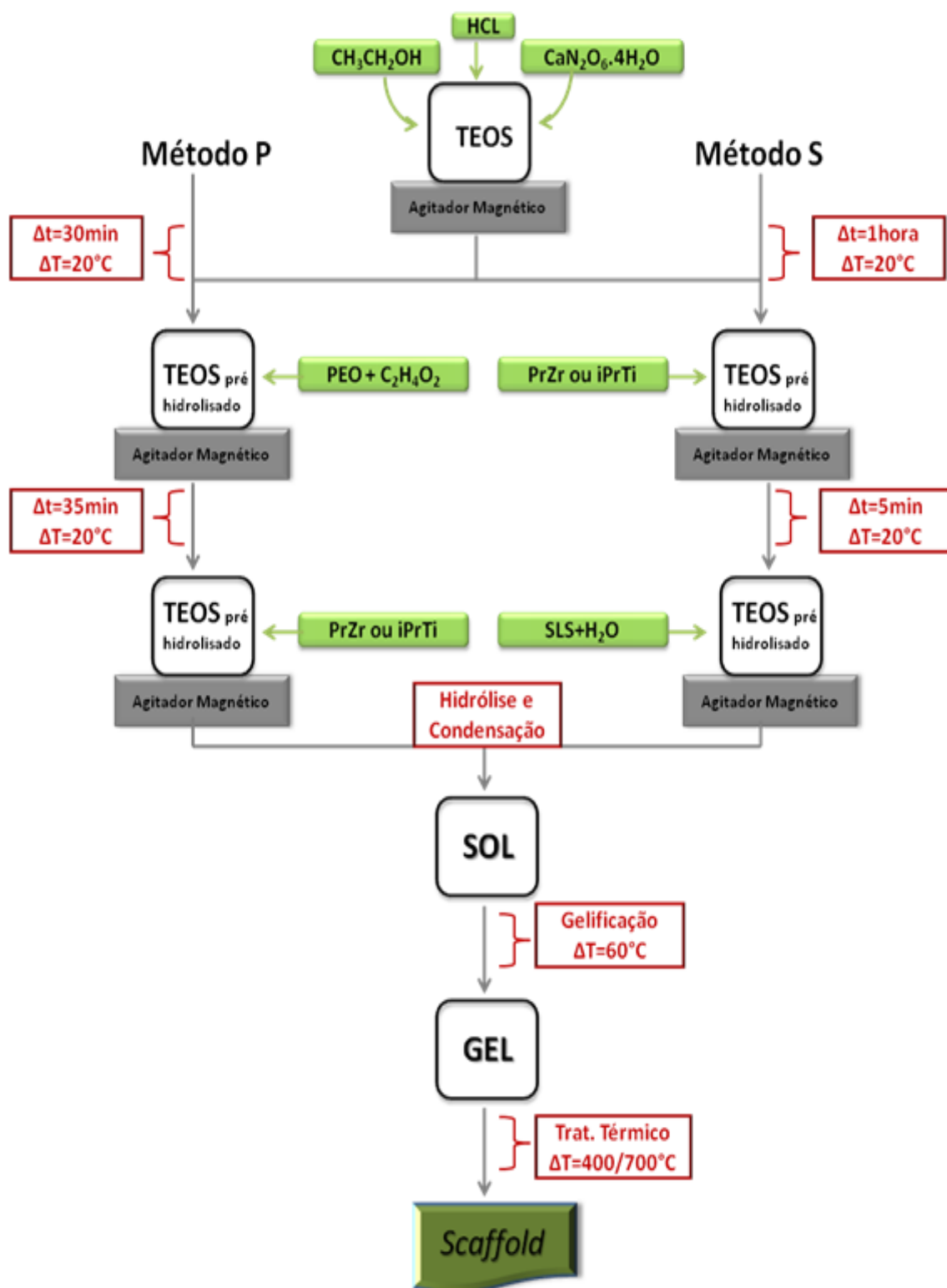


Figura 15 - Ilustração esquemática do processo sol-gel para a produção dos *scaffolds*

3.4. Técnicas de caracterização

Os *scaffolds*, assim como as amostras precursoras, foram caracterizados após a sua preparação, para analisar as propriedades estruturais e morfológicas, recorrendo a várias técnicas de caracterização descritas em seguida.

3.4.1. Área superficial Específica (BET)

As áreas superficiais específicas das amostras foram determinadas pelo método de adsorção física de gás de azoto, desenvolvido por Brunauer, Emmett e Teller (BET).

Este modelo BET é aplicado a representações gráficas das curvas isotérmicas de adsorção, que representam a quantidade adsorvida em função da pressão relativa (p/p^0), em que p^0 é a pressão de saturação da substância adsorvida à temperatura de ensaio. Para a realização destes ensaios, utilizou-se um equipamento *Micromeritics Gemini 2370V5*.

Segundo a classificação da IUPAC, existem seis tipos de curvas (figura 16), em que cada curva corresponde a um mecanismo de adsorção diferente, definindo desta forma o tipo de porosidade do material.

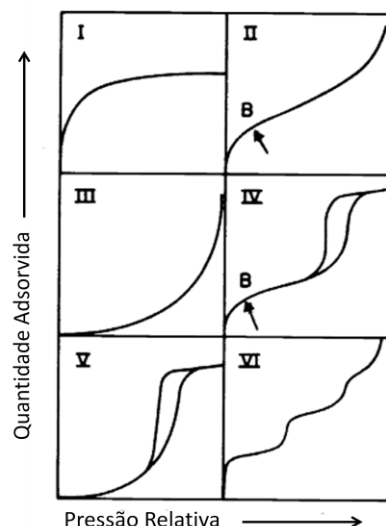


Figura 16 - Classificação das isotérmicas de adsorção segundo a IUPAC.

Adaptado de [104].

A isotérmica do tipo I está associada a materiais exclusivamente microporosos. Neste tipo de curvas, a distribuição do tamanho de poro pode ser analisada pela forma da curva, sendo que uma curva mais quadrada representa uma distribuição de tamanho de poro mais estreita. A isotérmica do tipo II, III e VI são características dos materiais não porosos. Contrariamente, a isotérmica do tipo IV, representa materiais com elevada porosidade e a isotérmica do tipo V representa materiais com micro e mesoporosidade [104].

Em alguns casos a curva de adsorção não é coincidente com a curva de dessorção, resultando num fenómeno denominado de histerese. Através deste fenómeno é possível fazer uma aproximação às estruturas dos poros presentes nas amostras. Existem quatro tipos de histerese, segundo a classificação da IUPAC, em que cada tipo representa uma determinada forma de poro. Na figura 17 estão representadas as curvas dos diferentes tipos de histerese.

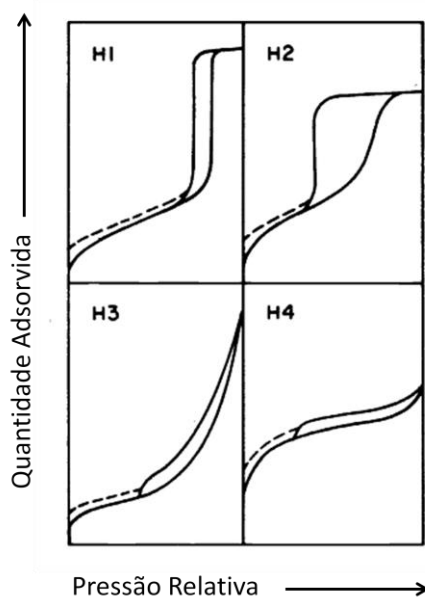


Figura 17 - Classificação dos ciclos de histerese segundo a IUPAC.

Adaptado de [104].

A histerese do tipo H1 é característica dos materiais porosos constituídos por aglomerados de partículas esféricas de tamanho uniforme. A histerese do tipo H2 está associada a poros de corpo largo com extremidades estreitas, do tipo forma de gargalo

de garrafa. A histerese do tipo H3 indica a existência de poros em fenda, originados por aglomerados de partículas em forma de placa. A histerese do tipo H4 está associada a poros estreitos em fenda ^[104].

3.4.2. Análise Térmica Diferencial e Termogravimétrica (ATD/TG)

Com o objetivo de estudar as temperaturas de calcinação dos surfactantes usados, realizou-se uma análise térmica diferencial e termogravimétrica num equipamento *Seteram Labsys 1600 DTA/TG-DSC*, com uma velocidade de aquecimento de 10 °C/min, num intervalo de temperatura de 25 a 1000 °C. Esta análise permite identificar as reações que ocorrem durante a subida de temperatura, assim como identificar as temperaturas a que ocorrem as principais reações.

3.4.3. Difração de Raio-X (DRX)

A caracterização cristalográfica das amostras precursoras e dos *scaffolds*, antes e após imersão em SBF, foi realizada com o objetivo de verificar a existência de possíveis fases cristalinas. Utilizou-se para esta análise um difractor *Rigaku Geigerflex D/Max-SériaC*, equipado com um monocromador curvo de grafite, com uma voltagem de 40 KV e uma corrente de 30 mA, utilizando uma radiação emitida K α . Para identificar as fases cristalinas recorreu-se à base de dados disponibilizada pela JCPDA/ICDD (*Joint Commitee on Powder Diffraction Standarda/International Center for Diffraction Data; Swarthmore, Pensilvânia, EUA*).

3.4.4. Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)

Todas as amostras foram caracterizadas morfológicamente por microscopia eletrónica de varrimento (SEM), num microscópio *Hitachi modelo S-4100*, provido de um sistema de espectrometria de raio-X de dispersão de energias (EDS) com um filamento de tungsténio, com uma voltagem de aceleração de 25 KV.

Para observar as amostras, estas foram fixas num porta amostras de alumínio, previamente polido, com cola de carbono (*Neubauer Chemikalien, Munster, Alemanha*)

e posteriormente secas numa estufa a 40 °C. Para as amostras em pó, foi utilizada uma fita-cola de dupla face de carbono para fixar as amostras no porta amostras de alumínio previamente polido. Todas as amostras foram revestidas através da deposição de um filme fino de carbono, num equipamento *Emitech K950*.

3.4.5. Espectroscopia de Infravermelhos (FTIR)

Com o objetivo de identificar os grupos funcionais presentes nas amostras precursoras e nos *scaffolds*, recorreu-se à espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR). Este é um método de caracterização utilizado para determinar a composição química, com base nas bandas de adsorção do espectro. Os espectros foram obtidos num espectrómetro de marca *Bruker* modelo *Tensor 27*, com uma resolução de 4 cm⁻¹. As amostras foram moídas e secas, para produzir pastilhas com o brometo de potássio (KBr), e foram analisadas pelo laboratório de análises do departamento de química da Universidade de Aveiro.

3.5. Ensaaios de Bioatividade *In Vitro*

Para avaliar a capacidade dos materiais de depositarem fosfato de cálcio na sua superfície, ou seja, a sua bioatividade, foram preparadas e utilizadas soluções que simulam o fluido fisiológico (SBF). Para preparar 500 ml de SBF, colocou-se em primeiro lugar 450 ml de água ultra pura num balão volumétrico previamente esterilizado. De seguida foram dissolvidos, um a um, os reagentes identificados numericamente, de 1 a 9, na tabela 6, por ordem numérica. Na etapa de adição do HCL, apenas metade foi adicionado (ordem 5), e a restante metade foi utilizada no final, após a adição do reagente de ordem 9, a fim de acertar o pH para valores de 7,4 (pH fisiológico). Por fim o SBF foi colocado num frigorífico (5-10 °C), com um prazo de validade de apenas 30 dias após a sua preparação.

Tabela 6 - Ordem de adição e quantidade de reagentes na preparação de SBF.

Ordem	Reagentes	Quantidade para 500 ml de Solução
1	NaCl	3,998 g
2	NaHCO ₃	0,175 g
3	KCL	0,112 g
4	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,114 g
5	HCL (1M)	19,5 ml
6	MgCL ₂ .6H ₂ O	0,152 g
7	CaCl ₂ .6H ₂ O	0,274 g
8	Na ₂ SO ₄	0,0359 g
9	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	3,0285 g

As comparações em termos de concentrações iónicas, mMol l⁻¹, entre o SBF preparado e o plasma humano encontram-se na tabela 7.

Tabela 7 - Concentrações iónicas, mMol l⁻¹, do SBF e do plasma humano.

	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ³⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma	142.0	5.0	2.5	1.5	103.0	27.0	1.0	0.5
SBF	142.0	5.0	2.5	1.5	147.8	4.2	1.0	0.5

Os testes de bioatividade foram realizados por imersão dos *scaffolds* e das amostras precursoras em SBF, durante diferentes períodos de tempo (2,7 e 24 horas, 7 e 14 dias). Para estes testes foram utilizados frascos de polipropileno, previamente esterilizado. Adicionou-se o SBF os fracos juntamente com as amostras, e em seguida foram colocados os frascos numa estufa a 37,4 °C por forma a simular a temperatura do corpo.

O volume de SBF utilizado para a realização dos testes foi calculado com base na equação:

$$V_S = S_a / 10$$

,onde V_S é o volume de SBF (ml) e S_a a área da superfície aparente da amostras (mm²).

Ao fim dos tempos de imersão, o SBF foi retirado utilizando uma seringa e um filtro de polietileno de 0,22 μm e as amostras foram colocadas em caixas de Petri numa estufa a 40 °C para secarem. O SBF foi colocado novamente nos tubos em refrigeração (~4 °C) até posterior análise.

A caracterização morfológica dos *scaffolds* e das amostras precursoras após imersão em SBF, foi realizada por SEM/EDS, a fim de verificar a possibilidade de deposição de fosfato de cálcio na superfície. Para identificação de possíveis fases cristalinas foi realizado um DRX e para identificar os grupos funcionais realizaram-se análises de FTIR.

A concentração dos iões de Ca^{2+} e PO_4^{3-} na solução de SBF, foi analisada por espectroscopia de emissão por plasma de acoplamento induzido (ICP), num espectrofotómetro *Jobin Yvon 70 Plus*, no laboratório central de análises da Universidade de Aveiro. Esta última análise permite-nos avaliar a variação da concentração iónica em solução.

Capítulo IV

4. Resultados e discussão

No presente capítulo, serão analisados e discutidos os resultados que dizem respeito à caracterização das estruturas precursoras e dos *scaffolds*, bem como serão avaliados os testes de bioatividade e caracterizadas as amostras após os mesmos.

4.1. Caracterização das estruturas precursoras

As estruturas precursoras, após serem tratadas termicamente a 400 °C e a 700 °C, foram analisadas por SEM, DRX, BET e FTIR.

As micrografias obtidas por SEM, das amostras ZrO e TiO tratadas a 400 °C e a 700 °C, encontram-se na figura 18. As amostras de ZrO apresentam uma superfície com um aspecto homogêneo e rugoso, enquanto que para as amostras de TiO observa-se uma superfície lisa e homogênea, com linhas de fratura. Verifica-se que, com o aumento da temperatura de tratamento térmico, as superfícies das amostras não sofrem quaisquer alterações significativas, mantendo o mesmo aspecto.

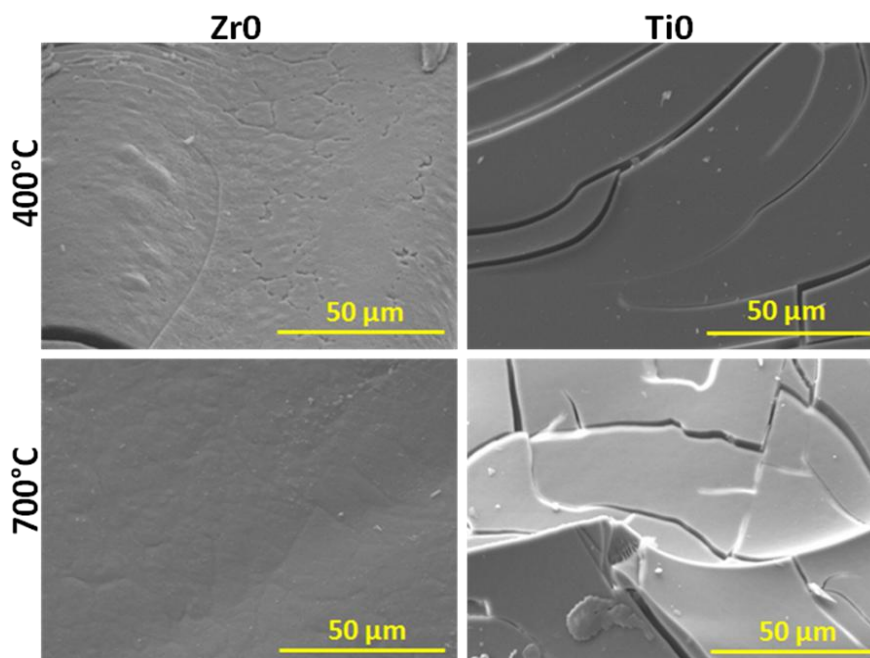


Figura 18 - Micrografias das amostras TiO e ZrO tratadas a 400 °C e 700 °C.

As isotérmicas de adsorção/dessorção das estruturas precursoras estão representadas na figura 19 (a) com tratamento térmico a 400 °C e (b) a 700 °C.

Verifica-se que a amostra de ZrO tratada a 400 °C apresenta uma isotérmica do tipo IV, segundo a classificação da IUPAC (figura 16), indicando a presença de uma elevada porosidade na amostra. Para esta amostra observa-se ainda, uma histerese do tipo H3, que está associado à presença de poros em fenda. Quando se aumenta a temperatura de tratamento térmico para 700 °C da amostra ZrO, verifica-se que ocorre uma diminuição da porosidade, observando-se uma isotérmica do tipo II para esta amostra, característica dos materiais não porosos. Esta diminuição de porosidade é acompanhada pelos valores de área superficial específica obtidos, que foram de $33.35 \pm 0.92 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ e de $16.79 \pm 0.95 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, para as amostras ZrO tratadas a 400 °C e para as amostras ZrO tratadas as 700 °C, respetivamente. Esta diminuição da porosidade e da área superficial devem-se à densificação do material durante o tratamento térmico efetuado. O diâmetro de poro apresentou um aumento não significativo de 3.8 nm para 4.2 nm, com o aumento da temperatura de tratamento térmico de 400 °C para 700 °C, estando dentro dos valores esperados para sistemas de $\text{SiO}_2\text{-ZrO}_2$ [105].

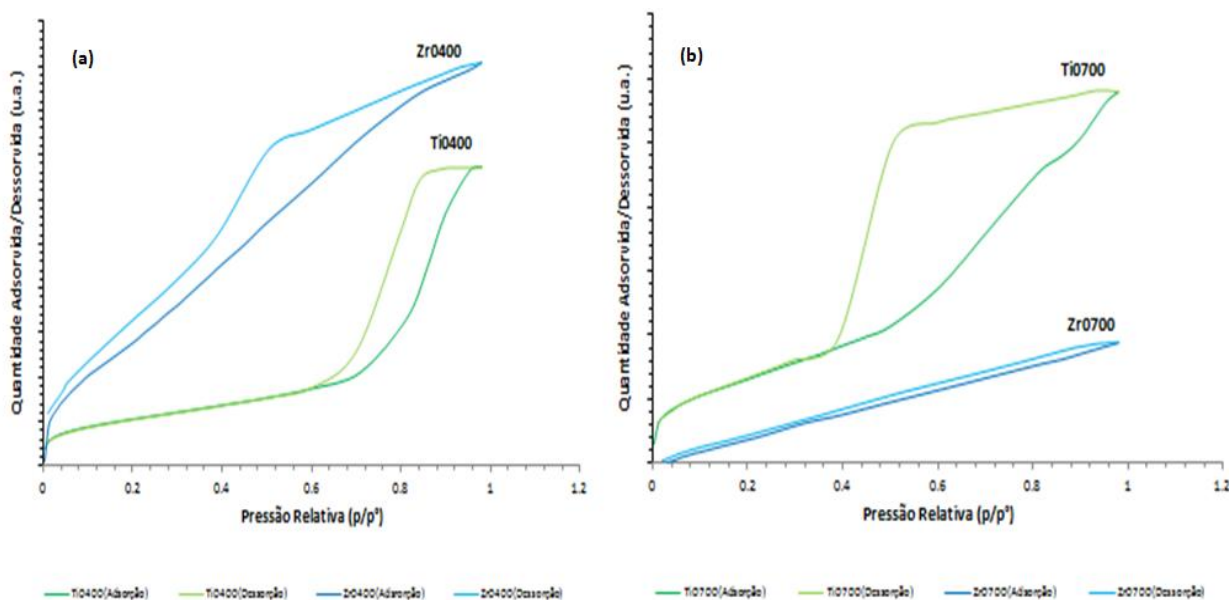


Figura 19 - Isotérmicas de Adsorção/Dessorção das amostras TiO e ZrO tratadas a (a) 400 °C e (b) 700 °C.

Para as amostras TiO tratadas a 400 °C e 700 °C observa-se uma isotérmica do tipo IV, característica dos materiais de elevada porosidade. As áreas superficiais específicas obtidas para estas amostras foram de $78.38 \pm 0.65 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ e de $23.20 \pm 0.33 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ para as amostras TiO400 e TiO700 respetivamente, mostrando uma diminuição da área superficial com o aumento da temperatura de tratamento térmico.

As áreas superficiais das amostras com titânia revelaram ser superiores às áreas superficiais das amostras com zircónia. O alcóxido de zircónio é mais reativo que o alcóxido de titânio (secção 2.5.), apresentando o primeiro, menores tempos de gelificação. Isto é, uma vez que as reações de formação da rede são mais rápidas, a rede formada apresenta-se mais desorganizada, formando poros mais pequenos e consequentemente apresentam maiores áreas superficiais. Uma possível explicação, apresentada por *Miller et al.* [citado por 106], admite que a diminuição da área superficial está relacionada com o aumento da homogeneidade na mistura dos alcóxidos de sílica-zircónia, sendo deste forma a baixa área superficial uma evidência indireta do alto grau de homogeneidade destes materiais.

A distribuição do tamanho médio de poro das amostras de titânia com diferentes tratamentos térmicos, está representada na figura 20. Ambas as amostras apresentam uma estreita distribuição de tamanho de poro, com diâmetros de 10 nm e 5,7 nm para as amostras tratadas a 400 °C e 700 °C, respetivamente. Como esperado, o tamanho de poro das amostras com titânia é superior ao tamanho de poro das amostras com zircónia, diminuindo para cerca de metade do valor após aumento da temperatura de tratamento térmico.

A figura 21 mostra os resultados da difração de raio-X (DRX) das amostras em estudo. Verifica-se que para as duas amostras, ZrO e TiO, os materiais são amorfos, tanto a 400 °C como a 700 °C, apresentando curvas típicas dos respetivos materiais amorfos. Este resultado sugere assim, que tanto o ZrO_2 como o TiO_2 , estão dispersos na matriz de SiO_2 , e que não existe a formação de cristais, pelo menos de tamanho suficiente para que sejam detetados pela técnica de raio-X. Pode ser considerado que os iões Ti^{4+} e Zr^{4+} entram na rede de SiO_2 , substituindo alguns dos iões Si^{4+} , levando a uma distribuição homogénea dos iões Ti^{4+} e Zr^{4+} na matriz de sílica [81,104].

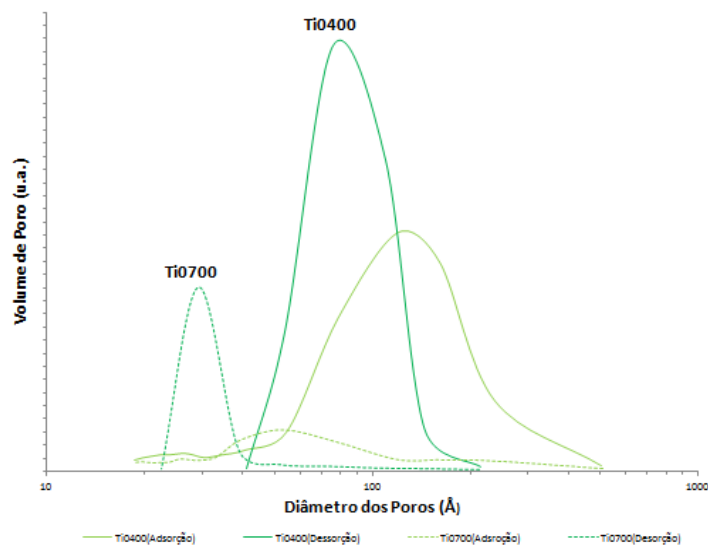


Figura 20 - Distribuição do tamanho de poros das amostras TiO tratadas a 700 °C e a 400 °C.

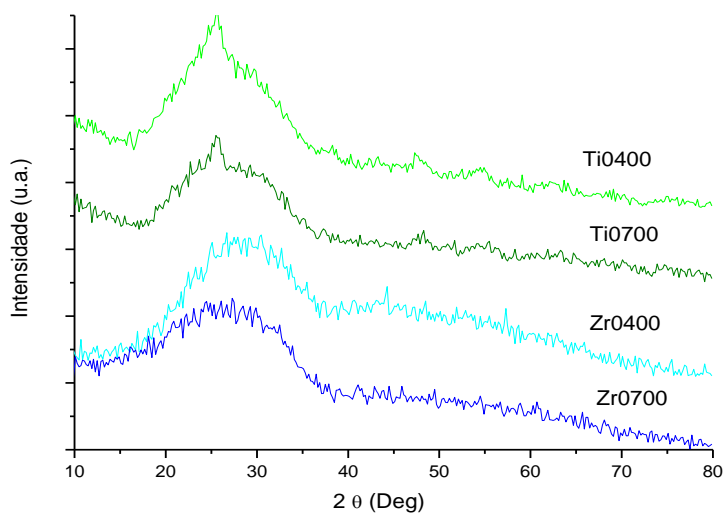


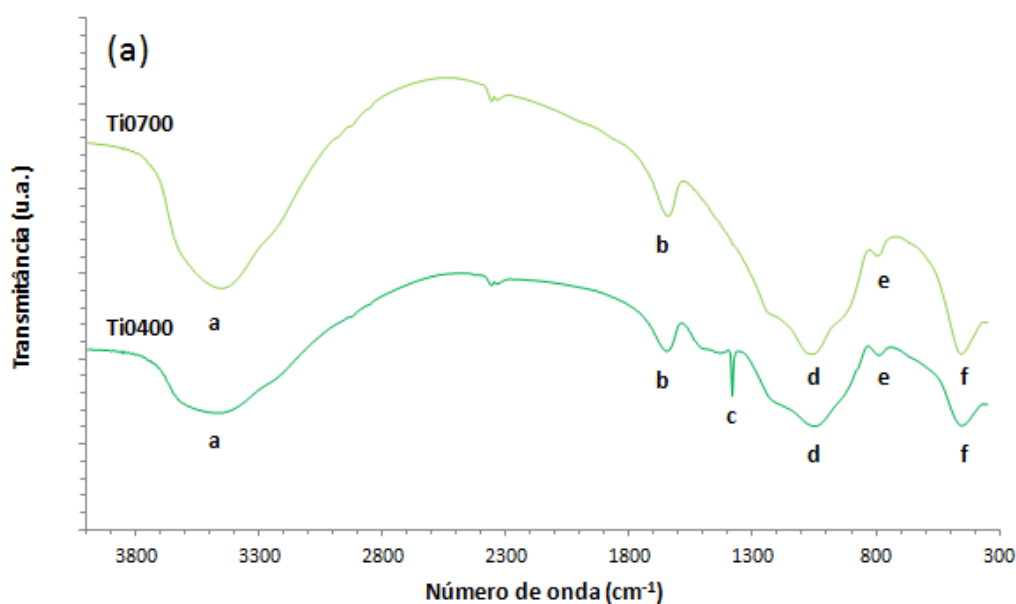
Figura 21 - Difratoograma de raio-X das amostras TiO e ZrO tratadas a 400 °C e 700 °C.

Na figura 22 estão representados os espectros de infravermelhos das amostras precursoras tratadas a 400 °C e a 700 °C, estando descritas na tabela 8 as bandas e respectivas atribuições das bandas representadas nos espectros, assim como a indicação das respectivas referências bibliográficas.

As bandas a 3474 cm^{-1} são atribuídas às vibrações do alongamento dos grupos OH^- da água adsorvida. Normalmente as moléculas com grupos HO apresentam espectros com bandas largas devido às ligações de hidrogénio. As bandas 1646 cm^{-1} e 1652 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de flexão dos grupos OH^- da água livre. Verifica-se que, com o aumento da temperatura de tratamento térmico, observa-se uma diminuição da intensidade das bandas características dos grupos OH^- , exceto no caso da banda a 3474 cm^{-1} . Este facto poderá ser devido à hidratação das amostras durante a sua preparação para os ensaios IV. As bandas atribuídas ao alongamento são desviadas para $3451\text{--}3454\text{ cm}^{-1}$, e as bandas atribuídas à flexão são desviadas para 1638 cm^{-1} e 1649 cm^{-1} .

A banda a 1384 cm^{-1} é atribuída às vibrações do alongamento assimétrico NO_3^- , características dos materiais produzidos com nitrato de cálcio. Observa-se que como aumento da temperatura de tratamento térmico, o pico característico desta banda desaparece, devido à calcinação do nitrato de cálcio a temperaturas inferiores aos 700°C .

As bandas a ~ 451 , ~ 788 e $\sim 1049\text{ cm}^{-1}$, são atribuídas às vibrações da flexão, do alongamento simétrico e do alongamento assimétrico das ligações Si-O-Si , respetivamente.



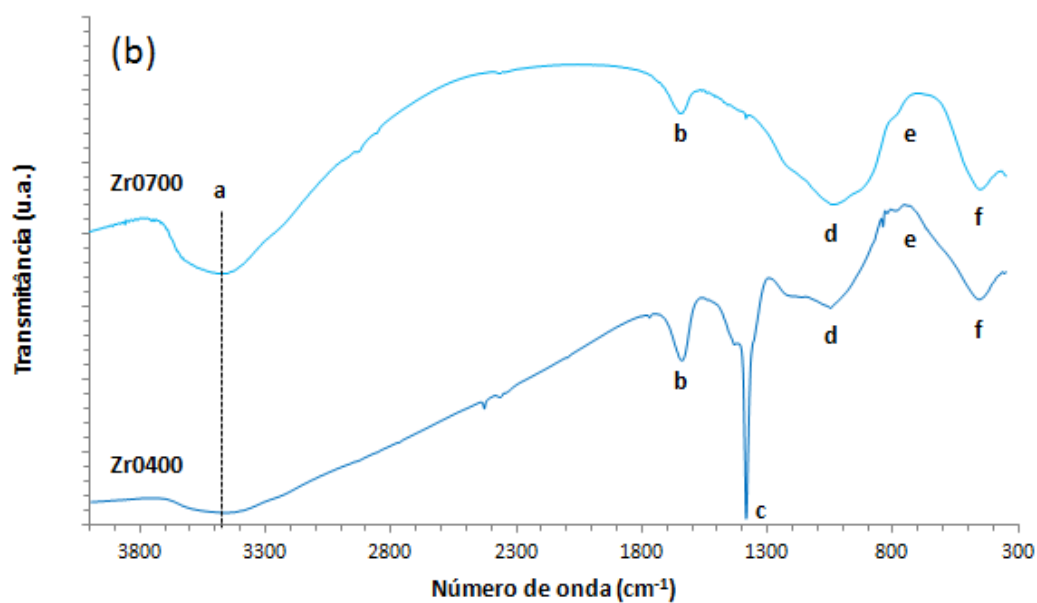


Figura 22 - Espectros de infravermelhos das amostras TiO (a) e ZrO (b) tratadas a 700 °C e a 400 °C.

Tabela 8 - Atribuição das bandas de adsorção de infravermelhos correspondentes às amostras ZrO e TiO (figura 22) tratadas a 400 °C e 700 °C.

Atribuição	Banda	Bandas de Adsorção no Infravermelho (cm ⁻¹)			
		400 °C		700 °C	
		Zr0	Ti0	Zr0	Ti0
Alongamento O-H, ^[85]	a	~3474	~3474	~3451	~3454
Flexão O-H, ^[83,85]	b	~1646	~1652	~1638	~1646
Alongamento assimétrico NO ³⁻ , ^[107]	c	~1384	~1384	-	-
Alongamento assimétrico Si-O-Si, ^[108]	d	~1048	~1049	~1041	~1045
Alongamento simétrico Si-O-Si, ^[108]	e	~789	~788	-	~794
Flexão Si-O-Si, ^[109]	f	~456	~454	~451	~456

4.2. Caracterização dos *Scaffolds*

4.2.1. Método S

As micrografias obtidas por SEM, das amostras ZrS1 e TiS1 tratadas a 700 °C, encontram-se na figura 23, com diferentes ampliações. As microestruturas representadas apresentam poros inferiores a 10 µm, numa rede de poros interligada. Esta porosidade, proveniente do processo de formação de espumas, contribui para uma maior área superficial, beneficiando deste modo a adesão local das proteínas, passagem de nutrientes e formação de uma camada de apatite no material ^[12]. No entanto, na rede macroporosa formada, não se verifica a existência de poros superiores a 100 µm, considerado favorável à entrada e crescimento das células osteoblastos, e à futura deposição do osso nas cavidades.

As amostras ZrS1 e TiS1 tratadas a 400 °C não apresentaram microestruturas porosas nas micrografias obtidas por SEM, e por este motivo não se apresentam as respetivas micrografias.

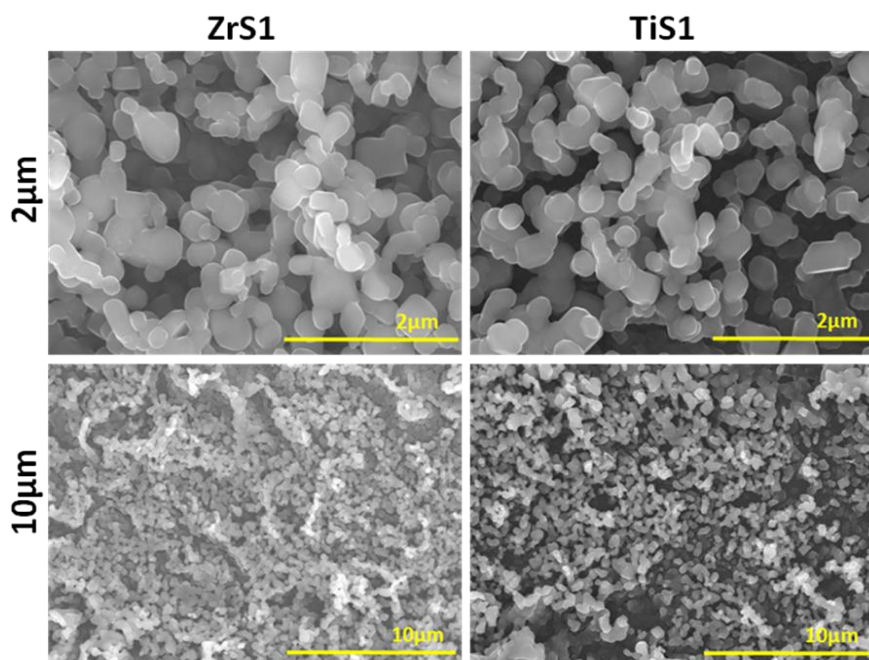


Figura 23 - Micrografias dos *scaffolds* ZrS1 e TiS1 tratados a 700 °C com diferentes ampliações.

As amostras ZrS2 e TiS2 (com maior concentração de SLS) tratadas a 400 °C e 700 °C, apresentam igualmente uma estrutura de macroporos interligados (figura 24). Observa-se que o tamanho dos macroporos, para as amostras com maiores concentrações de SLS ($>5 \mu\text{m}$), é superior ao tamanho de macroporos obtidos para concentrações inferiores de SLS ($<5 \mu\text{m}$). Comparando as amostras da figura 24, verifica-se que as estruturas tratadas a 400 °C apresentam poros com dimensões superiores às estruturas tratadas a 700 °C. No entanto, é visível que as amostras tratadas a 700 °C apresentam uma distribuição de tamanho de poro mais homogênea, com poros mais abertos e de paredes mais finas, bem como uma rede de poros mais interligada. Apesar das amostras S2 apresentarem tamanhos de poros superiores às amostras S1, a existência de poros superiores a 100 μm também não se verifica, o que é considerado pouco favorável para a formação do novo osso.

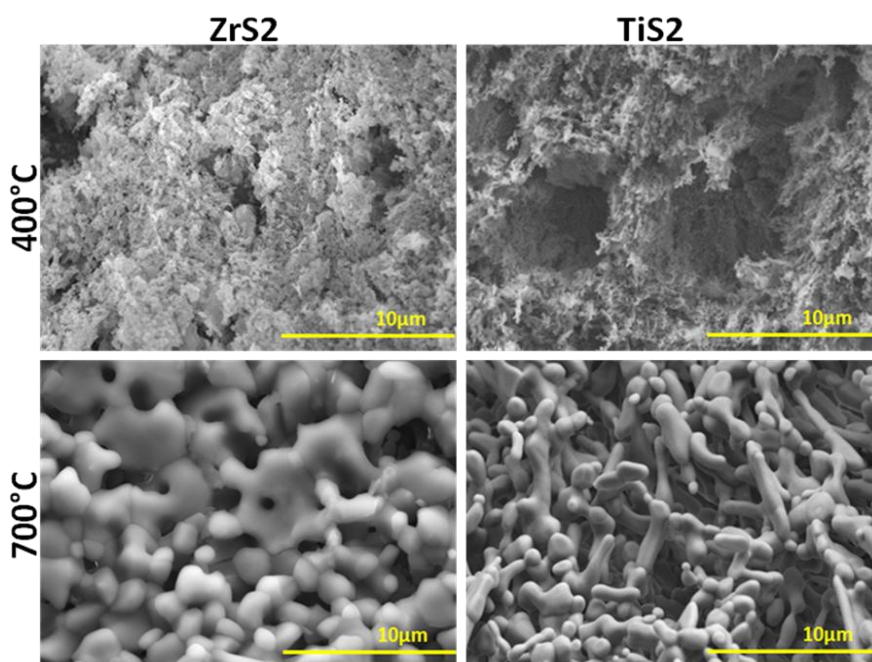


Figura 24 - Micrografias dos *scaffolds* ZrS2 e TiS2 tratados a 400 °C e a 700 °C.

O aumento da porosidade com o aumento da concentração de SLS, está de acordo com os resultados obtidos das isotérmicas de adsorção/dessorção representadas na figura 25 para as amostras com zircónia e na figura 26 para as amostras com titânia. Na

tabela 9 encontram-se algumas das características das amostras ZrS1 e TS1 tratadas a 700 °C, e das amostras ZrS2 e TiS2 tratadas a 400 °C e a 700 °C.

Todos os *scaffolds* produzidos com introdução de SLS como agente formador de poros, apresentaram uma isotérmica do tipo IV (segundo a IUPAC), característica de materiais com elevada porosidade, revelando a existência de mesoporos. As áreas superficiais das amostras ZrS1 e TiS1 são de $106.98 \pm 0.49 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ e de $85.001 \pm 0.68 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ respetivamente, verificando-se que ocorre um aumento da área superficial com o aumento da concentração de SLS, sendo que as áreas superficiais das amostras ZrS2 e TiS2 são de respetivamente $214.60 \pm 1.90 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ e $142.76 \pm 1077 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Os *scaffolds* de vidro bioativo produzidos por sol-gel apresentam geralmente área superficiais altas ($100\text{-}300 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) resultando em taxas de degradação elevadas e consequentemente formam rapidamente uma camada apatítica na sua superfície [2].

O aumento da área superficial, com o aumento da concentração de surfactante, é acompanhado de uma diminuição do diâmetro de poro. As amostras com zircónia apresentam uma distribuição de tamanho de poro mais larga com picos de 4,5 e 3,48 nm (figura 25(b)) para as amostras ZrS1 e ZrS2 respetivamente. Nos gráfico da figura 26(b), relativo às amostras de titânia, verifica-se uma distribuição de tamanho de poro mais estreita com picos de 4,33 e 3,33 nm para as amostras TiS1 e TiS2 respetivamente. Jones *et al.* [93], produziram *scaffolds* de vidro bioativo no sistema 70%SiO₂-30%CaO, em percentagem molar, pelo processo sol-gel com a introdução do SLS como agente formador de poros, e verificaram que um aumento da concentração do surfactante levava a um aumento da área superficial, e consecutivamente a uma diminuição do diâmetro de poro. No entanto, os autores verificaram que, o continuo aumento da concentração de surfactante não implicava o aumento da área superficial, mas pelo contrário, diminuía a resistência dos suportes de sílica. Isto mostra que, a determinada concentração a solução torna-se saturada de moléculas de SLS, deixando de existir moléculas de água disponíveis para criar as ligações com os grupos hidrofílicos das moléculas de surfactante, fazendo com que as moléculas de SLS se tornem num obstáculo à formação da rede de sílica [93].

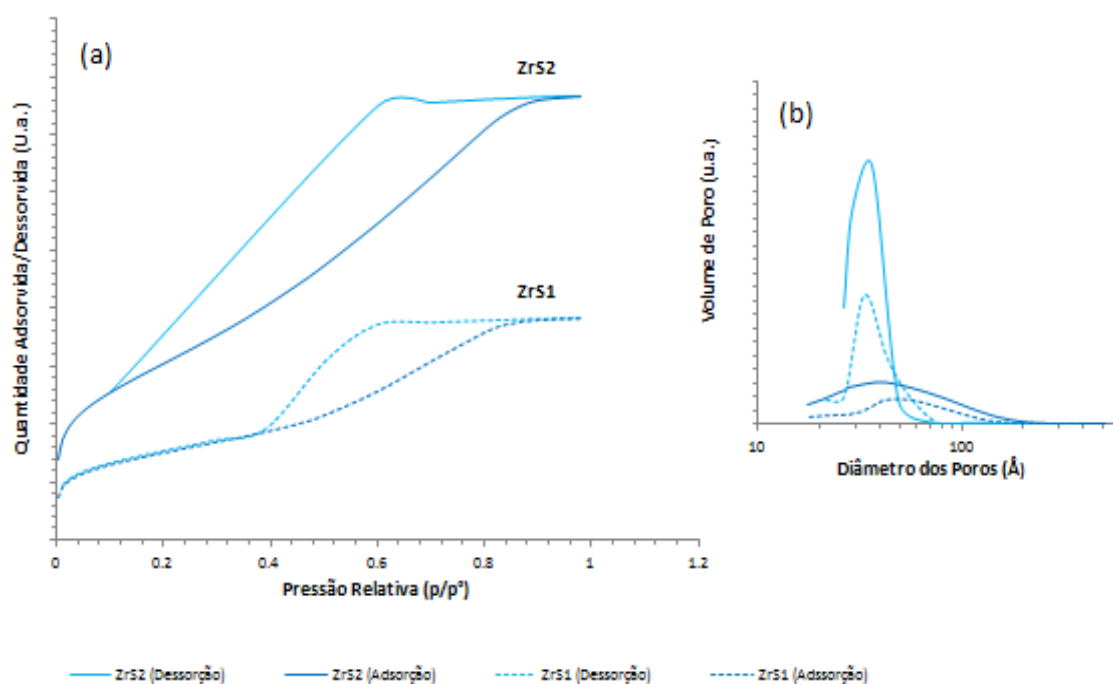


Figura 25- Isotérmicas de Adsorção/Dessorção (a) e distribuição do tamanho de poros (b) dos *scaffolds* ZrS1 e ZrS2 tratados a 700 °C.

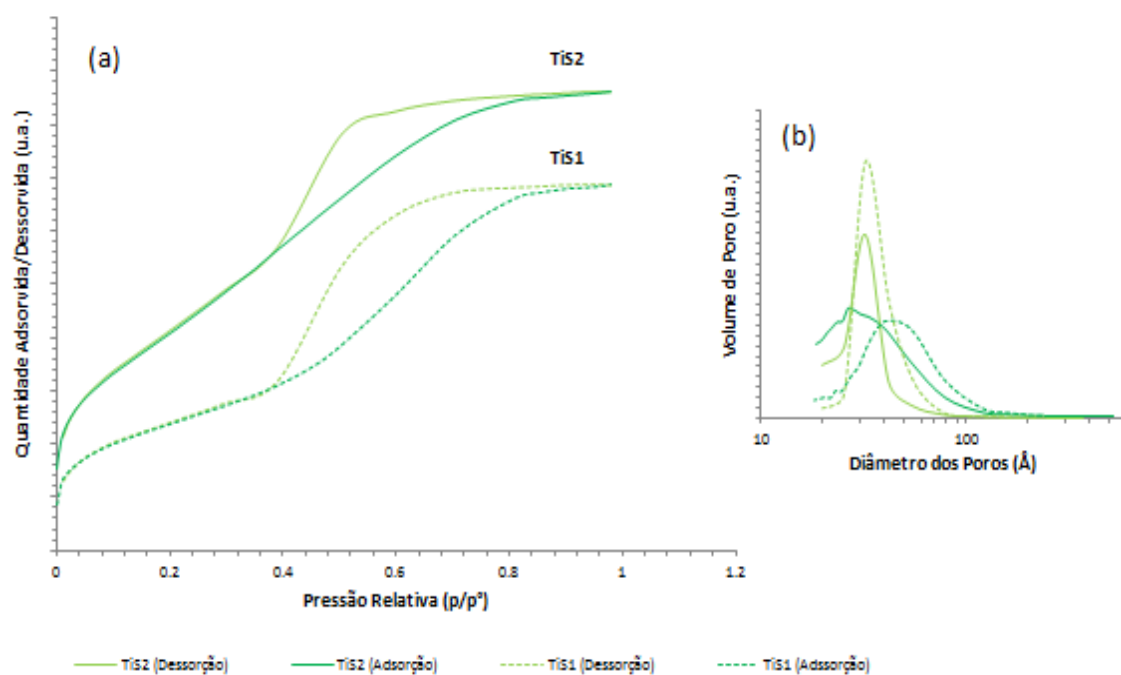


Figura 26 - Isotérmicas de Adsorção/Dessorção (a) e distribuição do tamanho de poros (b) dos *scaffolds* TiS1 e TiS2 tratados a 700 °C.

Relativamente à introdução dos óxidos de zircónio e titânio nos sistemas estudados, verifica-se que as amostras com zircónia apresentam áreas superficiais de valores superiores às amostras com titânia, em ambas as concentrações de SLS. Uma possível explicação deve-se ao facto do alcóxido de zircónio, utilizado neste estudo, ser mais reativo que o alcóxido de titânio, promovendo uma gelificação mais rápida. Trabalhos anteriores ^[92] mostraram que a estabilidade das espumas produzidas por um surfactante aniónico semelhante (SLES), diminuía com o tempo. Uma vez que as amostras preparadas com o alcóxido de zircónio gelificam mais rapidamente, vão “congelar” um maior número de bolhas das espumas produzidas pelo surfactante, no interior da estrutura, do que as amostras produzidas com o alcóxido de titânio. Como consequência, um maior número de bolhas aprisionadas irá promover uma maior porosidade, podendo contribuir para um aumento da área superficial específica.

Observando os resultados da tabela 9, verifica-se que o aumento da temperatura de tratamento térmico de 400 °C para 700 °C, levou a um aumento da área superficial das amostras. Para os *scaffolds* ZrS2 a área superficial aumentou de $102,96 \pm 0,90 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ (400 °C) para $214,60 \pm 1,90 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ (700 °C) e para os *scaffolds* TiS2 a área superficial aumentou de $95,340 \pm 0,80 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ (400 °C) para $142,76 \pm 1,77 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ (700 °C). Este aumento acontece porque à temperatura de 400 °C o surfactante não é totalmente removido (figura 27), e quando as amostras são tratadas a 700 °C ocorre a remoção total do surfactante, promovendo uma maior e mais interligada porosidade. Este resultado está de acordo com os resultados de Yokoi et al ^[95], que produziram estruturas porosas utilizando um surfactante aniónico (SDS- Dodecil Sulfato de Sódio), e verificaram que as amostras tratadas a 600 °C apresentavam maior área superficial devido à libertação do surfactante durante a calcinação.

Tabela 9 - Características dos *scaffolds* ZrS1 e TiS1 tratados a 400 °C e dos *scaffolds* ZrS2 e TiS2 tratados a 400 °C e a 700 °C.

Temperatura T.T. (°C)	Amostra	Tipo de Isotérmica	S _{BET} (m ² .g ⁻¹)	Diâmetro de poro (nm)
700	ZrS1	IV	106,98±0,49	4,50
	ZrS2	IV	214,60±1,90	3,98
	TiS1	IV	85,001±0,68	4,33
	TiS2	IV	142,76±1,77	3,33
400	ZrS2	IV	102,96±0,90	4,81
	TiS2	IV	95,340±0.80	9,22

S_{BET} – Área Superficial Específica; Diâmetro de poro calculado de acordo com a fórmula BJH: 4V/A.

A análise térmica diferencial (ATD), representada na figura 27, apresenta o comportamento térmico das amostras com SLS. Esta análise revelou a presença de um pico endotérmico e um pico exotérmico, com correspondente perda de massa na curva TG. O pico endotérmico nos 115 °C é atribuído à eliminação de água e etanol adsorvidos fisicamente. O pico exotérmico nos 381 °C é atribuído à remoção do surfactante. Alguns autores ^[92, 110] utilizarão surfactantes aniônicos (SDS- Dodecil Sulfato de Sódio e SLES- Lauril Éter Sulfato de Sódio) como agente formador de poros. Para criar estruturas mesoporosas, estes autores calcinaram as amostras utilizando temperaturas de 550 °C a 750 °C, mostrando que a estas temperaturas o surfactante estaria removido.

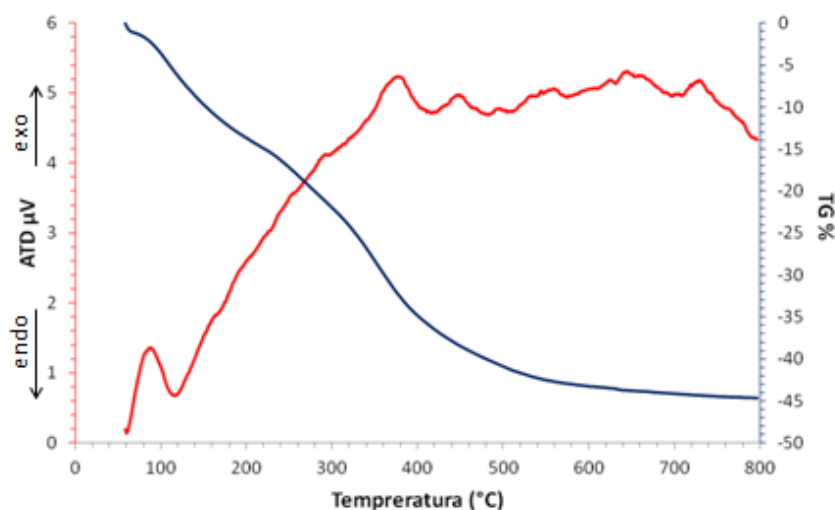


Figura 27 - ATD/TG do *scaffold* ZrS2 a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.

A figura 28 mostra o resultado da difração de raios-X (DRX) das amostras ZrS1, TiS1, ZrS2 e TiS2 tratadas a 700 °C. As amostras, em especial as TiS2 e TiS1, mostram alguns picos indicando a formação de alguns cristais. No difratograma correspondente à amostra TiS2 observa-se um pico intenso, estreito e bem definido. Segundo a ficha cristalográfica JCPDS 01-072-0916, estes picos de difração foram indexados à célula unitária ortorrômbica do tipo *Anhydrite*, Sulfato de cálcio ($\text{Ca}(\text{SO}_4)$), devido à identificação dos planos {200}, {102}, {220}, {022}, {122}, {302} e {322}. Estes resultados indicam que se formaram alguns cristais de sulfato de cálcio nos *scaffolds*. Observa-se ainda um pico de difração que foi indexado à célula unitária tetragonal do tipo *Quartzo* (SiO_2), devido à identificação do pico {011}. A formação de alguns cristais de sílica poderá ocorrer às temperaturas de tratamento térmico utilizadas, se existirem espécies livres de sílica suscetíveis de cristalizar.

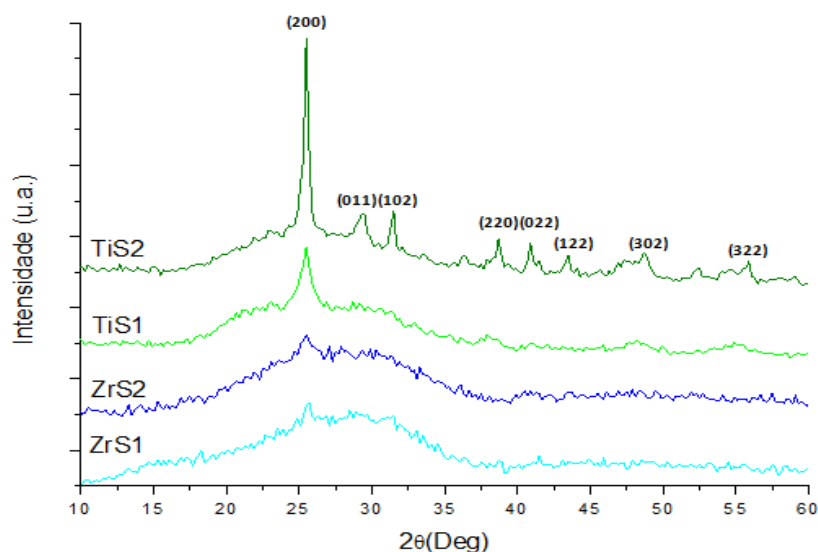


Figura 28 - Difratoograma de raio-X dos *scaffolds* ZrS1, ZrS2, TiS1 e TiS2 tratados a 700 °C.

A formação destes cristais foi confirmada através das micrografias SEM (figura29) e do respetivo gráfico de EDS (figura 30), obtidas após a imersão das amostras durante 7 horas em SBF. Apesar das análises de DRX terem confirmado a existência de cristais de sulfato de cálcio nas amostras antes da imersão em SBF, apenas se conseguem observar a formação destes cristais nas micrografias de SEM obtidas após imersão em SBF.

A utilização do surfactante aniónico SLS ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$) explica a existência de espécies de SO_4 nos *scaffolds*. Estas espécies apresentam uma grande afinidade com os iões de cálcio, resultando na formação de cristais de sulfato de cálcio ^[111].

A produção de substitutos ósseos de sulfato de cálcio hemihidratado e fosfato de cálcio para utilização em implantes dentários, foi referido por Wu *et al.* ^[112]. Segundo estes autores, os estudos *in vivo* realizados em mandíbulas de cães de raça *Beagle*, não mostraram quaisquer efeitos adversos como consequência de aplicação dos materiais utilizados, evidenciando ainda que ao fim de 3 semanas se verificou a formação do novo osso. O sulfato de cálcio é um substituto ósseo biocompatível e reabsorvível, e è geralmente utilizado juntamente com outros biomateriais ^[112].

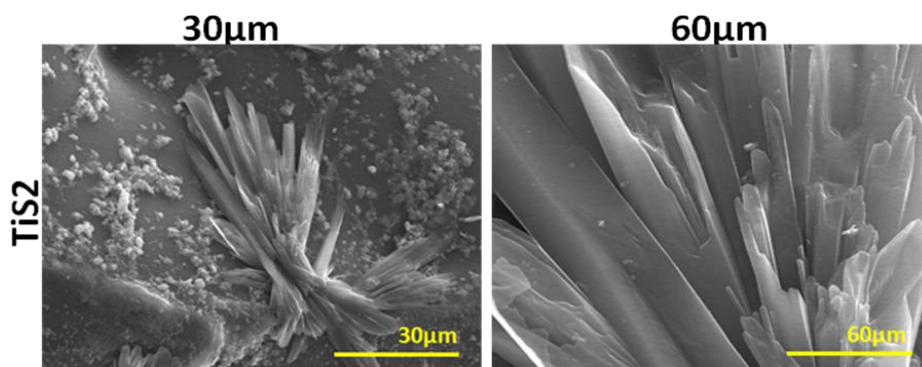


Figura 29 - Micrografias do *scaffold* TiS2 tratado a 700 °C ao fim de 7 horas de imersão em SBF.

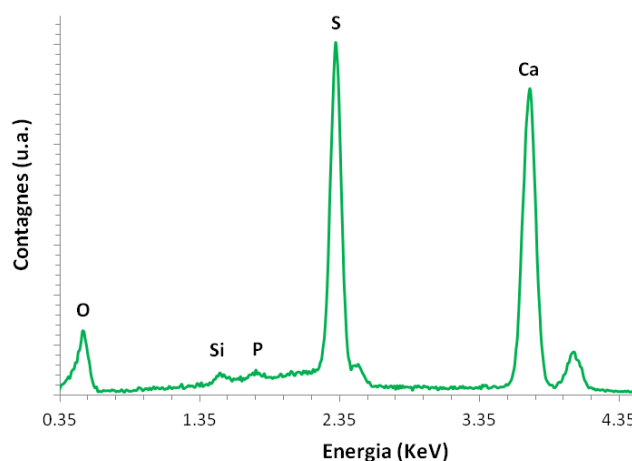


Figura 30 - Gráficos de EDS do *scaffold* TiS2 tratado a 700 °C ao fim de 7 horas de imersão em SBF.

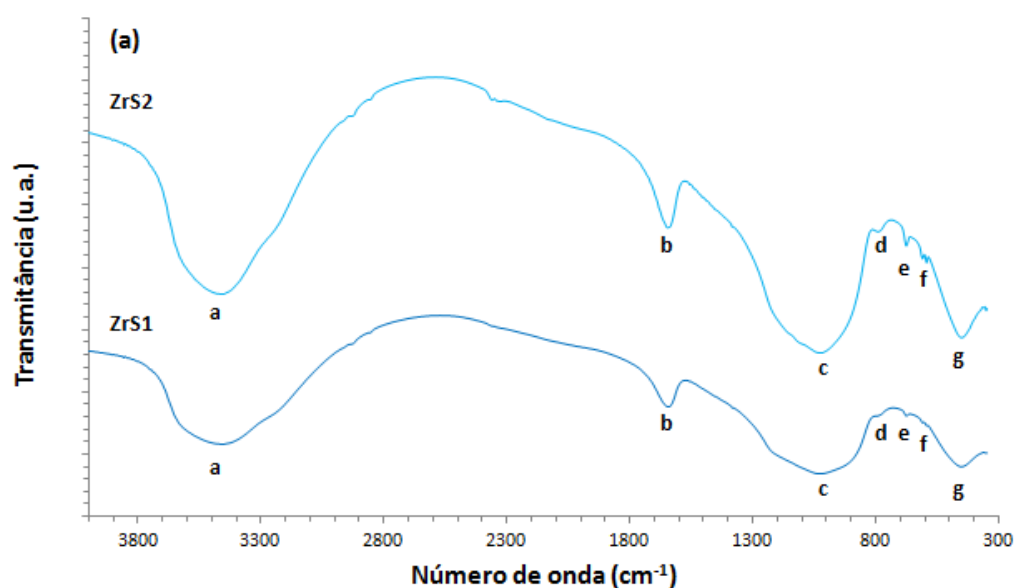
Na figura 31 estão representados os espectros de infravermelhos dos *scaffolds* ZrS1 e ZrS2 (a) e dos *scaffolds* TiS1 e TiS2 (b), estando descritas na tabela 10 as bandas e respectivas atribuições dos picos representados nos espectros.

As bandas a 3430 a 3456 cm^{-1} são atribuídas às vibrações do alongamento dos grupos OH^- da água adsorvida. As bandas a 1638 a 1646 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de flexão dos grupos OH^- da água livre.

Em *scaffolds* de vidro de sílica produzidos com pequenas quantidades de titânio e zircônio, como é o caso do presente trabalho, os espectros apresentados são muito semelhantes aos espectros de infravermelhos dos materiais de sílica pura, independentemente do método de processamento usado ^[113]. Isto sugere que os íons Ti^{4+}

e Zr^{4+} incorporam a rede de SiO_2 , substituindo alguns dos íons Si^{4+} , não existindo espécies livres dos alcóxidos metálicos. Este resultado é confirmado pela análise de DRX (figura 27), onde não se verifica a existência de quaisquer fases cristalinas dos óxidos de zircônio e titânio. No entanto, observam-se pequenas bandas características destes materiais. As bandas a 676 e 677 cm^{-1} são atribuídas às vibrações do alongamento Ti-O-Ti e Zr-O-Zr e as bandas a 595 e 594 cm^{-1} são atribuídas às vibrações do alongamento Zr-O e Ti-O . Uma possível explicação, é a provável interação entre as moléculas de SLS e os alcóxidos de zircônio e de titânio, promovendo ligações desta natureza. Não foi encontrada na literatura referência à ocorrência de interações entre os íons destes alcóxidos metálicos e os íons do surfactante aniônico em uso neste trabalho.

As bandas a $\sim 455\text{ cm}^{-1}$, são atribuídas às vibrações da flexão das ligações Si-O-Si .



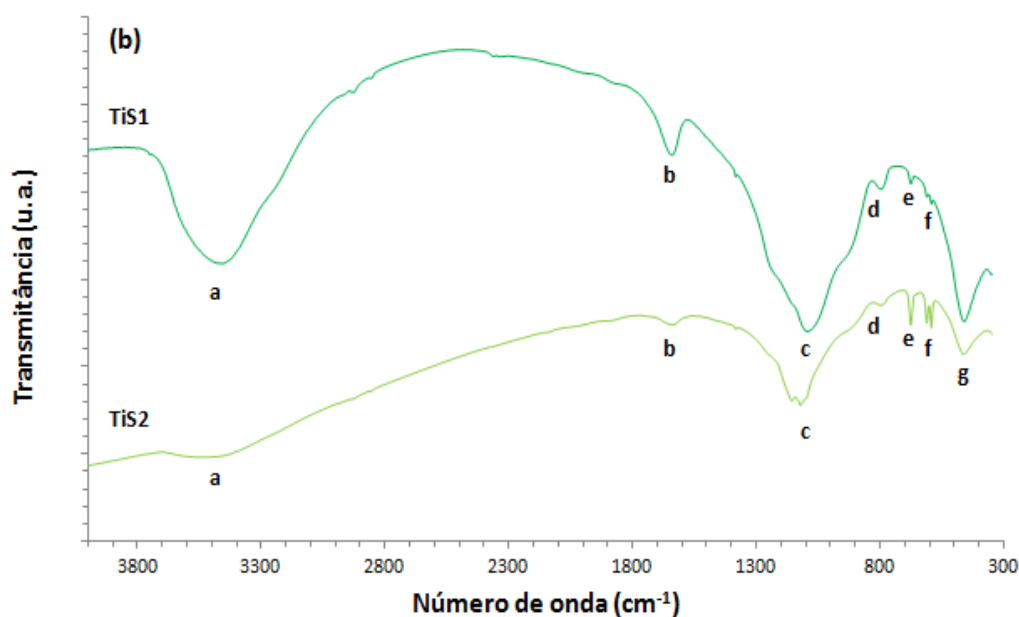


Figura 31 - Espectros de infravermelhos dos *scaffolds* ZrS1 e ZrS2 (a) e TiS1 e TiS2 (b) tratados a 700 °C.

Tabela 10 - Atribuição das bandas de adsorção de infravermelhos correspondentes aos *scaffolds* ZrS1 e ZrS2 (figura 31a), TiS1 e TiS2 (figura 31b) tratados a 700 °C.

<u>Atribuição</u>	Banda	Bandas de Adsorção no Infravermelho (cm ⁻¹)			
		S1		S2	
		Zr	Ti	Zr	Ti
Alongamento O-H, ^[85]	a	~3454	~3456	~3455	~3430
Flexão O-H, ^[83,85]	b	~1646	~1638	~1645	~1638
Alongamento assimétrico Si-O-Si, ^[108]	c	~1027	~1096	~1024	~1122
Alongamento simétrico Si-O-Si, ^[108]	d	~787	~798	~791	~799
Alongamento Ti-O-Ti, Zr-O-Zr, ^[83,114]	e	~676	~677	~677	~677
Alongamento Ti-O, Zr-O, Si-O, ^[83,114]	f	~594	~594	~595	~594
Flexão Si-O-Si, ^[109]	g	~452	~461	~453	~463

4.2.2. Método P

Na figura 32 estão representadas as micrografias obtidas por SEM das amostras ZrP1, ZrP2, TiP1 E TiP2. Todas as amostras apresentam uma rede homogénea de macroporos interligados, sendo que para maiores concentrações de PEO, observam-se macroporos de maiores dimensões, com espessuras das paredes dos poros mais grossas. Comparando estas micrografias com as micrografias obtidas para os *scaffolds* produzidos com SLS (método S), verifica-se que o tamanho dos macroporos é substancialmente maior, visto que para os primeiros se observaram macroporos inferiores a 10µm e que para estes *scaffolds* são observados macroporos de dimensões superiores. Este facto é atribuído à diferente forma de atuação das moléculas dos dois surfactantes. Como citado anteriormente (secção 2.5.1.5), as moléculas de SLS formam micelas de formas esféricas que se agregam e posteriormente são adsorvidas na superfície (figura 10 secção 2.5.1.5). As moléculas de PEO formam micelas em forma de vesículo à medida que são adsorvidas na superfície, formando posteriormente supermicelas (figura 12 secção 2.5.1.5). Estas supermicelas, como indica o nome, apresentam dimensões superiores às micelas formadas pelo SLS. Após a calcinação do surfactante, as supermicelas formadas pelo PEO, originam uma estrutura de macrocanais de maiores dimensões comparativamente com a estrutura originada pelas micelas de SLS. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por *Yuan et al.* ^[115], que sugeriram que as moléculas de um surfactante não iónico atuam como agente direto na formação de macrocanais, através da formação de supermicelas.

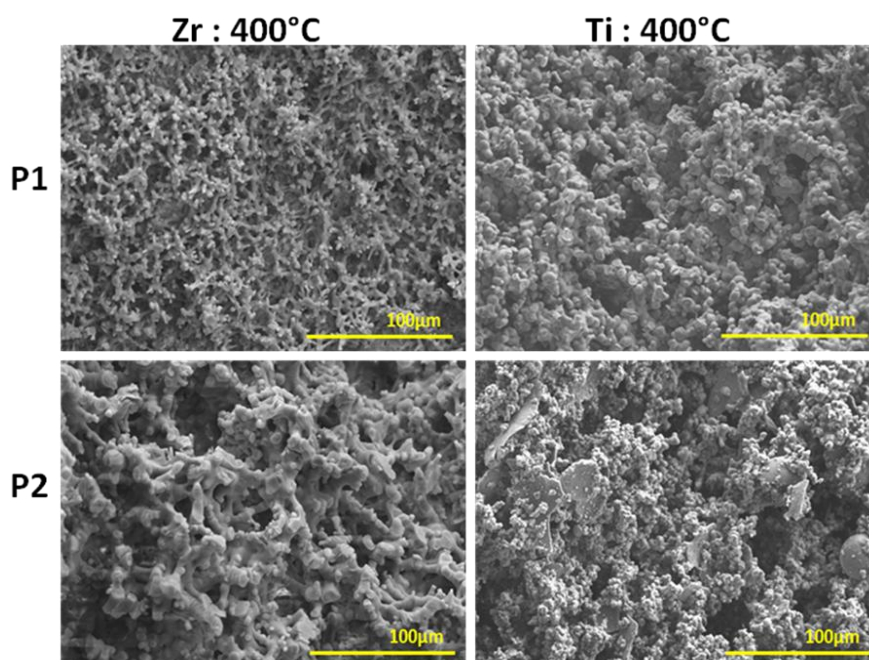


Figura 32 - Micrografias dos *scaffolds* ZrP1, ZrP2, TiP1 e TiP2 tratados a 400 °C.

Nos *scaffolds* produzidos com PEO, o aumento da temperatura de tratamento térmico de 400 °C para 700 °C promoveu uma visível diminuição do tamanho de poros. Observando as micrografias das amostras ZrP2 e TiP2, representadas na figura 33, verifica-se uma diminuição do tamanho dos macroporos, mais notória nas amostras com titânio, que revelam um elevado aumento na espessura das paredes dos poros.

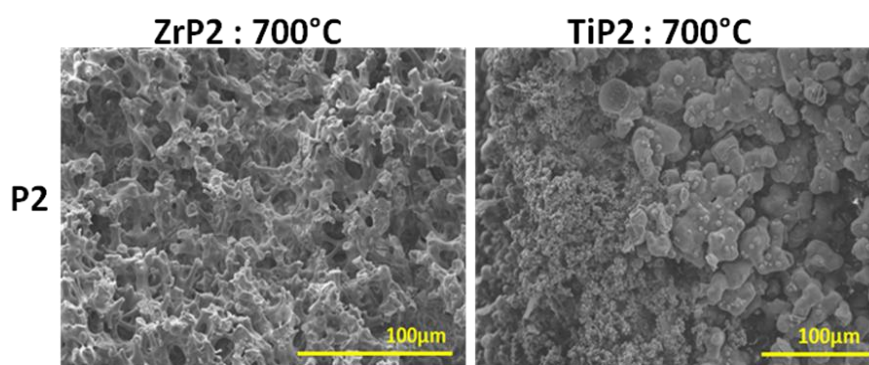


Figura 33 - Micrografias dos *scaffolds* ZrP2 e TiP2 tratados a 700 °C.

As isotérmicas de adsorção/dessorção dos *scaffolds* tratadas a 400 °C, assim como a distribuição do tamanho de poros, estão representados na figura 34 para as amostras ZrP1 e ZrP2 e na figura 35 para as amostras TiP1 e TiP2. Na tabela 11 encontram-se algumas das características das amostras ZrP1 e TP1 tratadas a 400 °C, e das amostras ZrP2 e TiP2 tratadas a 400 °C e a 700 °C.

Adotando a nomenclatura da IUPAC, todos os *scaffolds* produzidos com introdução do PEO como agente formador de poros, apresentaram uma isotérmica do tipo IV, característica de materiais com elevada porosidade, revelando a existência de mesoporos. Verifica-se que ocorre um aumento da área superficial com o aumento da concentração de PEO, sendo que as áreas superficiais dos *scaffolds* de zircónia aumentaram de $256.94 \pm 1.57 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ para $262.03 \pm 0.48 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, e as áreas superficiais dos *scaffolds* com titânia aumentaram de $148.00 \pm 0.86 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ para $156.03 \pm 2.40 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. Relativamente ao tamanho do mesoporo, os *scaffolds* obtidos apresentaram um diâmetro de poro entre 3,5 e 5 nm, sendo que com o aumento da concentração do surfactante, o diâmetro de poro aumenta, tanto para os *scaffolds* de zircónia como para os *scaffolds* de titânia. De acordo com Zhang *at al.* ^[116], o aumento da concentração do surfactante não iónico, promove o aumento do diâmetro de poro, e consequente diminuição da área superficial. No presente trabalho, o aumento do diâmetro de poro não foi significativo, observando-se, no entanto, um pronunciado aumento da área superficial específica com o aumento da concentração de PEO (tabela 11).

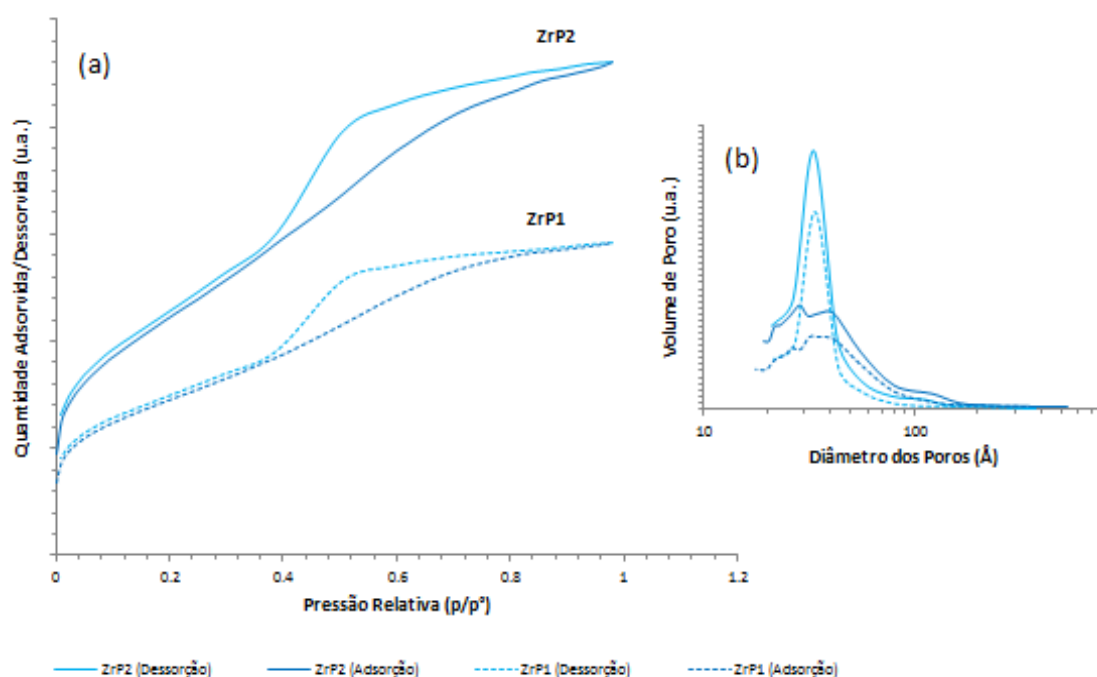


Figura 34 - Isotérmicas de Adsorção/Dessorção e distribuição do tamanho de poros dos *scaffolds* ZrP1 e ZrP2 tratados a 400 °C.

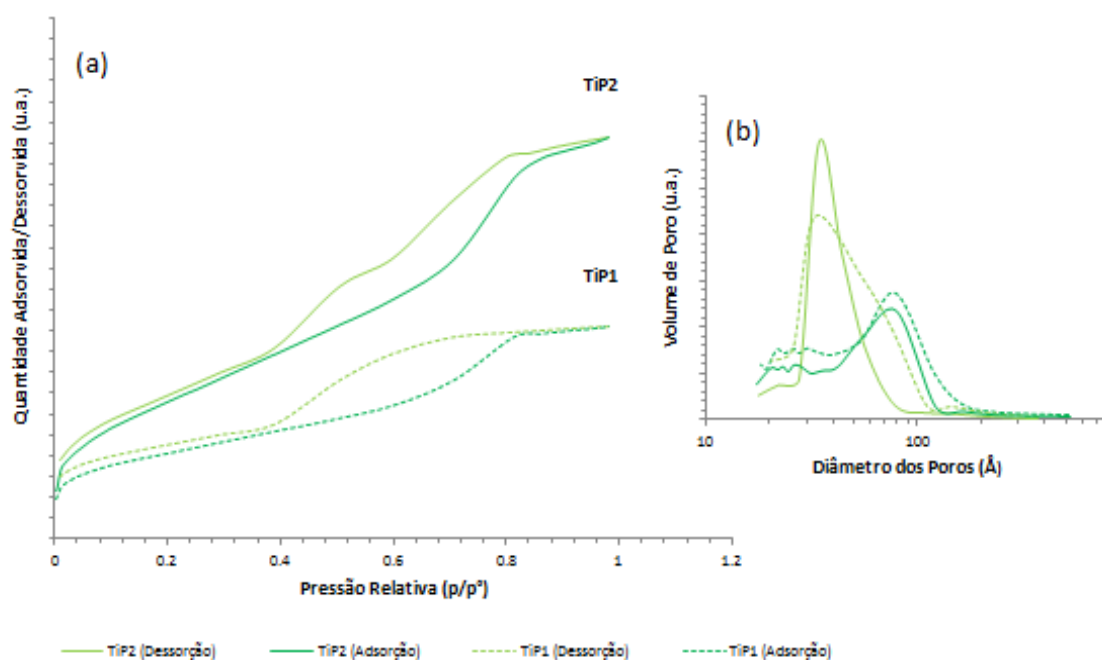


Figura 35 - Isotérmicas de Adsorção/Dessorção e distribuição do tamanho de poros dos *scaffolds* TiP1 e TiP2 tratados a 400 °C.

Aumentando a temperatura de tratamento térmico de 400 °C para 700 °C, verificou-se uma considerável diminuição no valor da área superficial específica dos *scaffolds* e consequentemente um aumento do tamanho médio de poro (tabela 11). Este facto é atribuído à eliminação de uma fração significativa de poros, devido à densificação que ocorre para temperaturas superiores.

Ao comparar os valores obtidos para a área superficial dos *scaffolds* de zircónia e dos *scaffolds* de titânia, verifica-se que os primeiros exibem um valor substancialmente superior. Este resultado deve-se ao facto de que, nas estruturas com zircónia se formam micelas em forma de vesículo de menores dimensões que as micelas formadas nas estruturas de titânia. Isto acontece pois o propóxido de zircónio é mais reativo e gelifica mais rapidamente que o isopropóxido de titânio, promovendo deste modo um menor número de unímeros agregados, resultando como consequência em micelas de tamanho menores ^[98]. Como resultado obtêm-se mesoporos de menores dimensões nos *scaffolds* com zircónia, e consequentemente, um valor de área superficial superior, comparando com os *scaffolds* com titânia (tabela 11).

Comparando os valores das áreas superficiais dos *scaffolds* produzidos com PEO e dos *scaffolds* produzidos com SLS, verifica-se um aumento considerável deste valor para os *scaffolds* produzidos com PEO. Do mesmo modo, quando se compara os valores de área superficial específica dos sistemas com zircónia e dos sistemas com titânia, observa-se para os primeiros valores de área superficial específica superiores. Conclui-se, deste modo, que o uso de PEO como agente formador de poros em sistemas de SiO₂-CaO-ZrO₂ mostra-se mais interessante para a produção de *scaffolds* para regeneração óssea.

Os macroporos interligados, que se observam nas micrografias, juntamente com a mesoestrutura exibida por estes *scaffolds*, são requisitos essenciais para os *scaffolds* a utilizar em regeneração óssea. É esta meso-macroestrutura que favorece a dissolução e bioatividade por parte dos *scaffolds*. Acrescentando a isto, a progressiva dissolução dos *scaffolds* à base de vidro, pode promover o desaparecimento das paredes finas dos poros, e consequentemente uma maior interligação entre os poros ^[99].

Tabela 11 - Características dos *scaffolds* ZrP1 e TiP1 tratados a 400 °C e dos *scaffolds* ZrP2 e TiP2 tratados a 400 °C e a 700 °C.

Temperatura T.T. (°C)	Amostra	Tipo de Isotérmica	S _{BET} (m ² .g ⁻¹)	Diâmetro de poro (nm)
400	ZrP1	IV	256,94±1,57	3,49
	ZrP2	IV	262,03±2,48	3,67
	TiP1	IV	148,00±0,86	4,50
	TiP2	IV	156,03±2,40	4,73
700	ZrP2	IV	187,46±1,55	3,73
	TiP2	II	33,920±1,27	5,03

S_{BET} – Área Superficial Específica; Diâmetro de poro calculado de acordo com a fórmula BJH: 4V/A.

A figura 36 é uma fotografia dos *scaffolds* obtidos no sistema 58%SiO₂-23%CaO-9%ZrO₂ (a) e no sistema 58%SiO₂-23%CaO-9%TiO₂ (b), com a introdução do PEO como agente formador de poros, e com tratamento térmico a 400 °C. Observa-se pela fotografia que os *scaffolds* obtidos são blocos monolíticos sem fraturas, sendo que a sua forma final é a do frasco de polietileno usado durante a sua gelificação. Este resultado mostra que é possível produzir estes *scaffolds* com uma grande diversidade de formas, sendo que a forma final é a adquirida pela simetria do molde utilizado.

A diferença de tamanho observado entre os *scaffolds* acontece porque os *scaffolds* de zircónia gelificam mais rapidamente que os *scaffolds* de titânia, como referido. Devido a isto, os *scaffolds* com zircónia apresentam uma estrutura mais desordenada e com poros de menores dimensões, promovendo uma maior retração da estrutura relativamente aos *scaffolds* de titânia.

Como constatado, quando se aumenta a temperatura de tratamento térmico de 400 °C para 700 °C dos *scaffolds* produzidos com PEO, ocorre uma diminuição da área superficial específica e um aumento do tamanho médio de poro. No entanto, ainda se observa nas micrografias a existência de macroporos, bem como valores de área superficial relativamente altos, e a estrutura obtida apresenta a forma de um bloco monolítico sem fraturas.

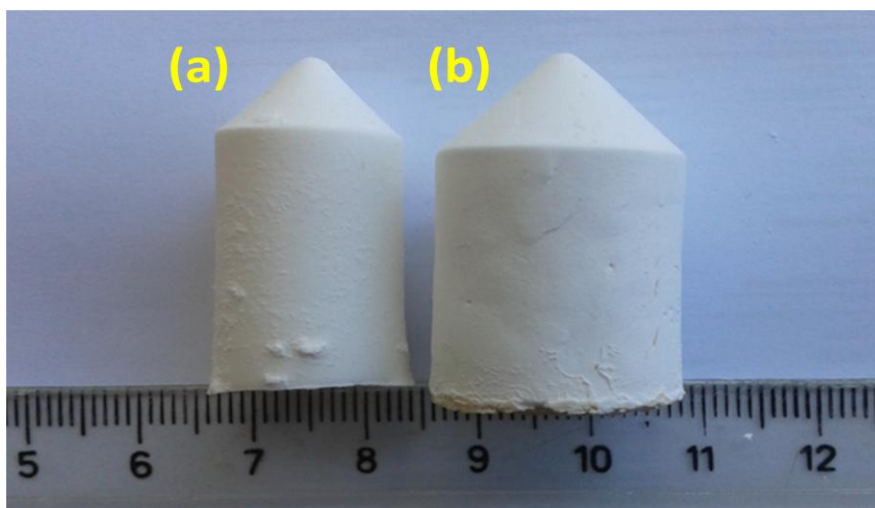


Figura 36 - Monolíticos obtidos pelo método P de (a) zircónia-ZrP2 e de (b) titânia-TiP2.

A análise térmica diferencial (ATD), representada na figura 37, dá informação sobre o comportamento térmico das amostras com PEO. Esta análise revelou a presença de um pico endotérmico e de um pico exotérmico, com correspondente perda de massa na curva TG. O pico endotérmico nos 107 °C é atribuído à eliminação de água e etanol adsorvidos fisicamente. O pico exotérmico nos 262 °C é atribuído à remoção do surfactante. Verifica-se assim, que as temperaturas de 400 °C e 700 °C usadas nos tratamentos térmicos dos *scaffolds*, foram suficientemente elevadas para que todo o surfactante fosse removido por calcinação. Este resultado está de acordo com trabalhos anteriores onde *Marque et al.* ^[99, 100] produziram *scaffolds*, utilizando o PEO como agente formador de poros. Estes autores realizaram a calcinação das amostras a temperaturas entre 600 °C e 700 °C, tendo conseguido a remoção total do PEO.

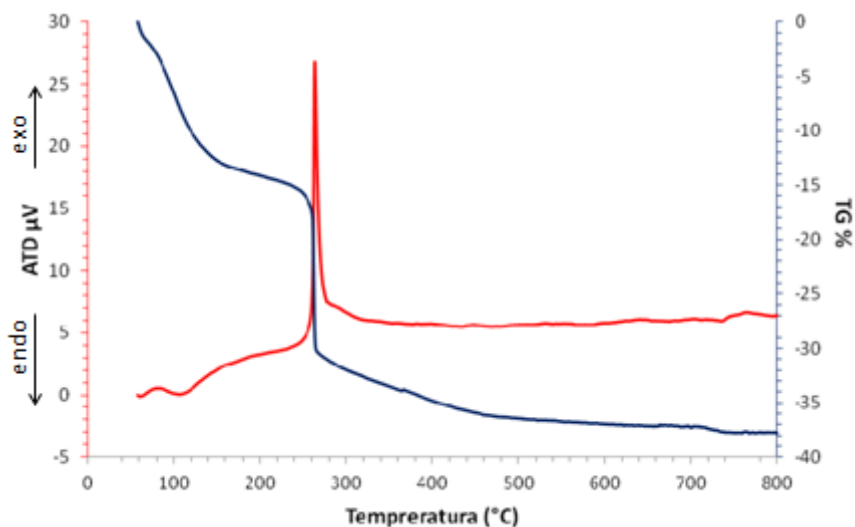


Figura 37 - ATD/TG do *scaffold* ZrP2 a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.

Os resultados da difração de raio-X (DRX) dos *scaffolds* com PEO tratados a 400 °C estão representados na figura 38. Verifica-se que tanto para os *scaffolds* com zircônia como para os *scaffolds* com titânia, os materiais são amorfos, independentemente da concentração de surfactante usada. O difratograma de raio-X apresentado é representativo de todas as amostras, sendo que para as amostras tratadas a 700 °C, o *scaffolds* apresentam também curvas características de materiais amorfos.

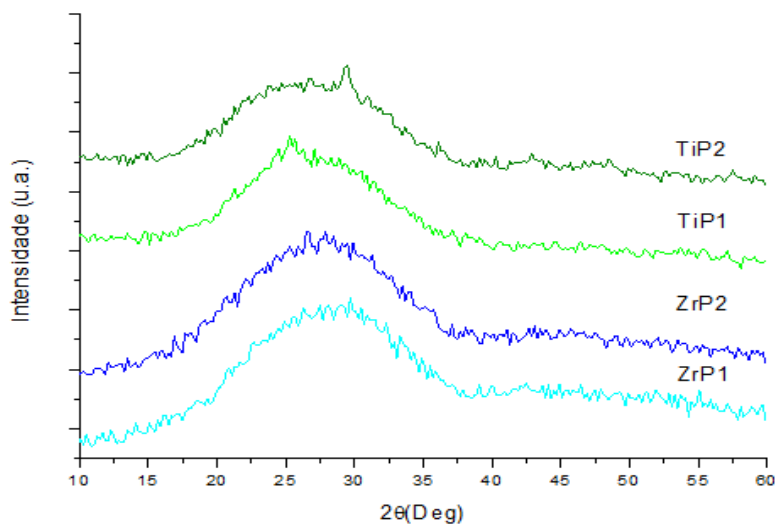


Figura 38 - Difratograma de raio-X dos *scaffolds* ZrP1, ZrP2, TiP1 e TiP2 tratados a 400 °C.

Na figura 39 estão representados os espectros de infravermelhos dos *scaffolds* ZrP1 e ZrP2 (a) e dos *scaffolds* TiP1 e TiP2 (b) tratados a 400 °C, estando descritas na tabela 12 as bandas e respectivas atribuições dos picos representados nos espectros.

A banda a $\sim 3450\text{ cm}^{-1}$ é atribuída às vibrações do alongamento dos grupos OH⁻ das ligações de Si-OH maioritariamente, podendo ser também da água residual ^[101]. A banda a $\sim 1646\text{ cm}^{-1}$ é atribuída às vibrações de flexão dos grupos OH⁻ da água livre.

As bandas a 1384 cm^{-1} , são atribuídas às vibrações do alongamento assimétrico NO³, características dos materiais produzidos com nitrato de cálcio. O pico característico desta banda não se apresenta nas bandas dos *scaffolds* tratados a 700 °C, devido à calcinação do nitrato de cálcio a temperaturas inferiores aos 700 °C.

As bandas a ~ 470 , ~ 790 e $\sim 1060\text{ cm}^{-1}$, são atribuídas às vibrações da flexão, do alongamento simétrico e do alongamento assimétrico das ligações Si-O-Si, respetivamente.

Tal como observado para os *scaffolds* com SLS (secção 4.2.1.), os *scaffolds* com PEO apresentam espectros muito semelhantes aos espectros de infravermelhos dos materiais de sílica pura. Este resultado é esperado, pois vidros de sílica produzidos com pequenas quantidades de titânia e zircónia, como é o caso do presente trabalho, apresentam estes espectros, independentemente do método de processamento usado ^[113].

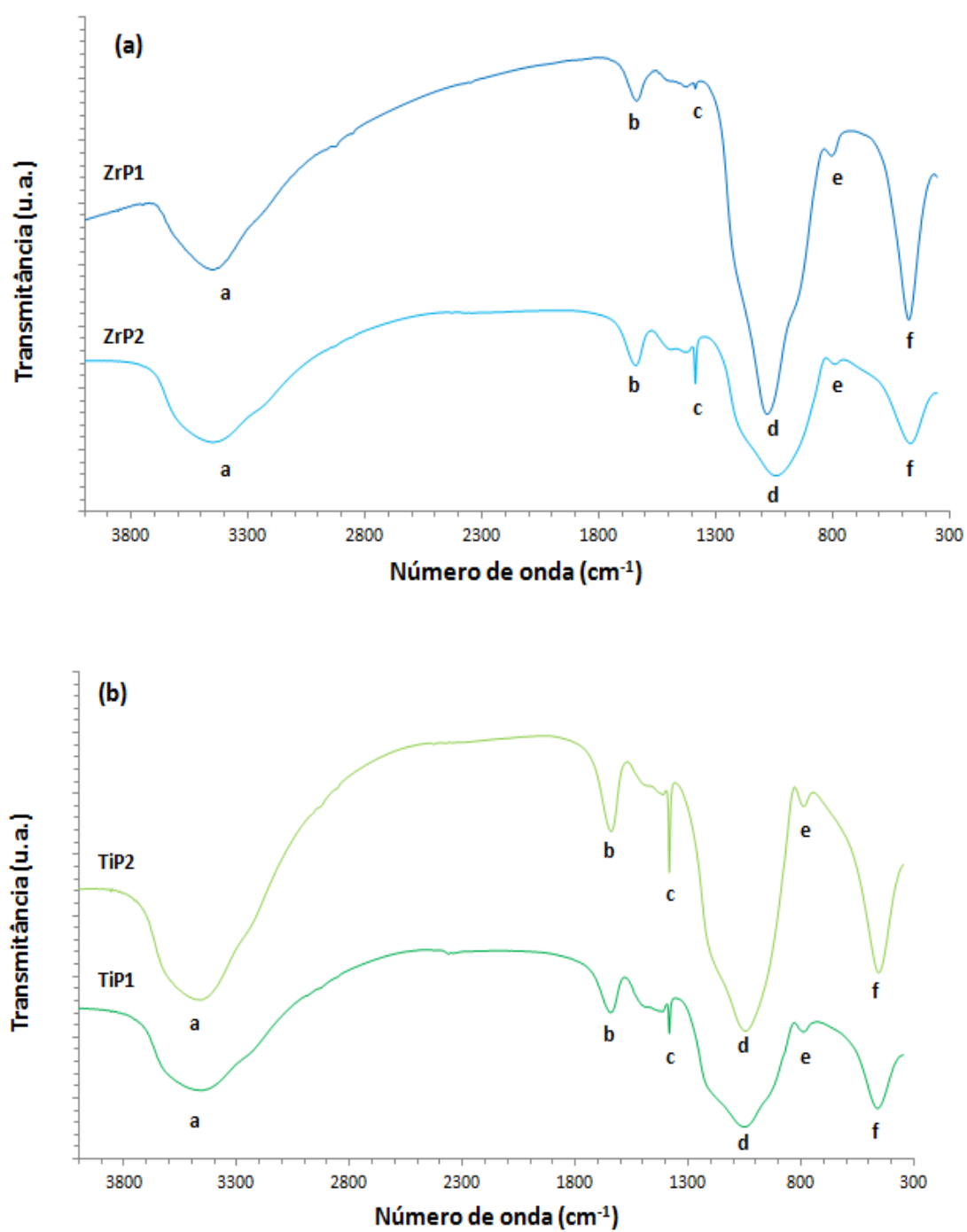


Figura 39 - Espectros de infravermelhos dos *scaffolds* ZrP1 e ZrP2 (a) e TiP1 eTiP2 (b) tratados a 400 °C.

Tabela 12 - Atribuição das bandas de adsorção de infravermelhos correspondentes aos *scaffolds* ZrP1 e ZrP2 (figura 39a), TiP1 e TiP2 (figura 39b) tratados a 400 °C.

<u>Atribuição</u>	Banda	Bandas de Adsorção no Infravermelho (cm⁻¹)			
		P1		P2	
		Zr	Ti	Zr	Ti
Alongamento O-H, [85]	a	~3450	~3455	~3450	~3454
Flexão O-H, [83,85]	b	~1636	~1645	~1638	~1638
Alongamento assimétrico NO³⁻, [107]	c	~1382	~1384	~1384	~1384
Alongamento assimétrico Si-O-Si, [108]	d	~1076	~1050	~1038	~1071
Alongamento simétrico Si-O-Si, [108]	e	~800	~789	~786	~796
Flexão Si-O-Si, [109]	f	~470	~463	~464	~468

4.3. Ensaios de bioatividade

4.3.1. Análise das modificações da superfície

A observação da superfície das amostras após a imersão em SBF, foi analisada microscopicamente recorrendo ao SEM/EDS, sendo também efetuada uma análise por DRX e por FTIR. Para este estudo foram selecionadas as amostras com maiores áreas superficiais. Na figura 40 estão representadas as micrografias das amostras precursoras, Zr0 e Ti0 tratadas a 400 °C, ao fim de 24 horas, 7 e 14 dias de imersão em SBF. Na figura 41 estão representados os respetivos EDS das amostras ao fim de 7 dias de imersão.

A análise da superfície dos *scaffolds* por SEM evidenciou a formação de precipitados de apatite, e em alguns casos a formação de uma camada superficial. Através da análise por EDS, confirmou-se que a camada formada é rica em cálcio e fosforo. Ao fim de 24

horas observam-se pequenos depósitos de fosfato de cálcio na superfície. Ao fim de 7 horas de imersão aumenta a quantidade de pequenos depósitos de fosfato de cálcio na superfície. Nas amostras com tempos de imersão de 14 dias, verifica-se que a superfície está coberta por uma camada de fosfato de cálcio. A morfologia dos precipitados em forma de nódulos esféricos é típica dos precipitados de fosfato de cálcio que usualmente se depositam sobre os materiais com bioatividade ^[101]. Comparando as amostras com zircónia com as amostras com titânia, vê-se claramente que nas primeiras a formação de precipitados é bastante mais pronunciada chegando mesmo a observar-se uma ligeira camada superficial por debaixo dos precipitados esféricos, principalmente para tempos mais longos. De facto, através da análise de EDS confirma-se que nas amostras com zircónia a presença de fosforo e cálcio é superior à que se observa sobre as amostras com titânia. A deteção dos elementos químicos por análise EDS efetuada pelo equipamento não é apenas superficial mas inclui também elementos presentes no próprio *scaffold*, cuja composição inclui sílica, pequenas quantidades de cálcio e zircónia ou titânia, mas não inclui o fósforo. Tendo isto, e verificando que no EDS às amostras precursoras com zircónia não foi detetado nenhum pico correspondente à identificação da sílica, conclui-se que a camada apatítica formada na superfície é mais profunda no que nas amostras precursoras com titânia, onde foi identificado um pico correspondente à sílica. Os resultados de EDS são semelhantes para os *scaffolds* ZrS2 e TiS2 (figura 43) e para os *scaffolds* ZrP2 e TiP2 (figura 45), verificando-se que os *scaffolds* com zircónia apresentam já um pico de sílica mas ainda assim menos intenso do que o dos *scaffolds* com titânia. Conclui-se deste modo que os *scaffolds* com zircónia apresentam maior bioatividade *in vitro* do que os *scaffolds* com titânia, o que está em concordância com o facto da área superficial dos primeiros ser mais elevada.

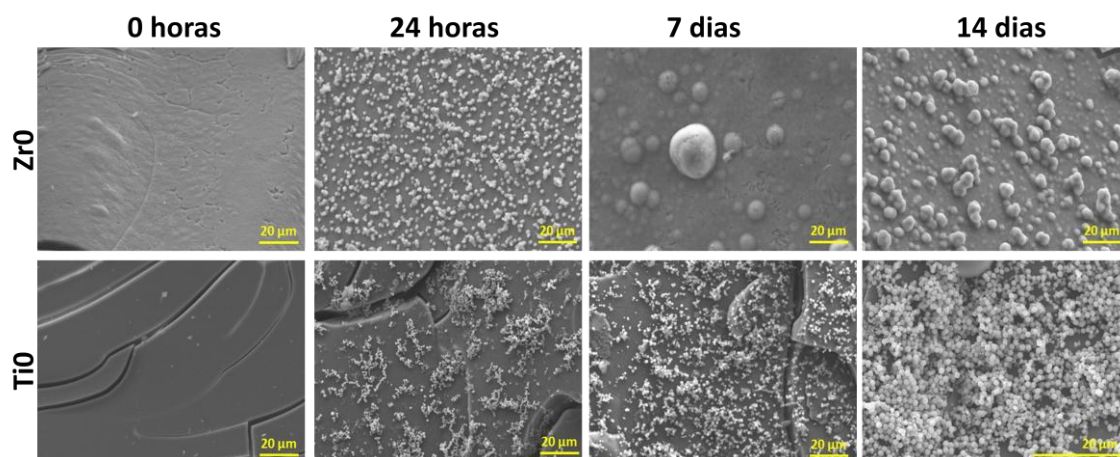


Figura 40 - Micrografias das amostras ZrO e TiO tratadas a 400 °C ao fim de diferentes tempos de imersão em SBF.

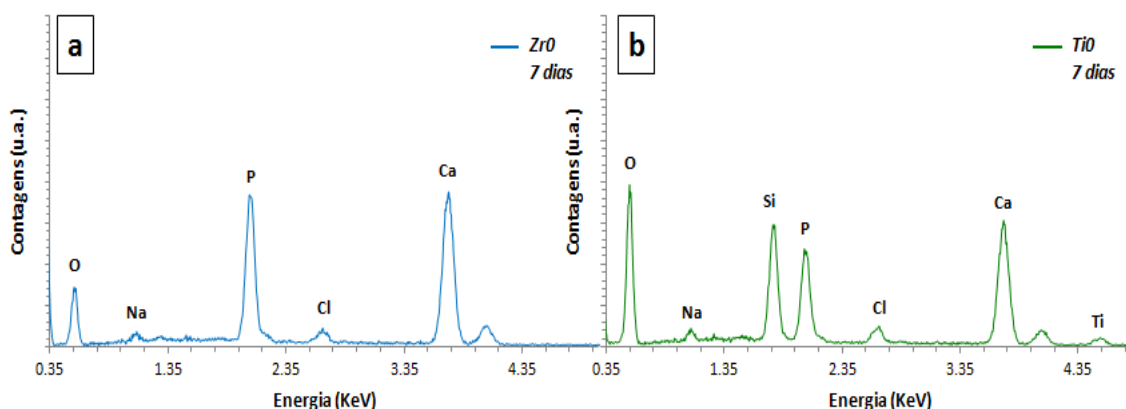


Figura 41 - Gráficos de EDS das amostras (a) ZrO e (b) TiO ao fim de 7 dias de imersão em SBF.

Na figura 42 estão representadas as micrografias dos *scaffolds* com maiores concentrações de SLS, ZrS2 e TiS2 tratadas a 700 °C, ao fim de 24 horas, 7 e 14 dias de imersão em SBF.

Observa-se que em todos os *scaffolds* ocorreu uma deposição contínua da camada apatítica, e que nos *scaffolds* de zircônia essa deposição foi mais evidenciada. Para os *scaffolds* com titânia verifica-se que ocorreu uma maior deposição ao fim de 7 dias de imersão em SBF, enquanto que para os *scaffolds* com zircônia verifica-se que essa

deposição foi crescente ao longo do tempo, sendo que a maior deposição se observa ao fim de 14 dias.

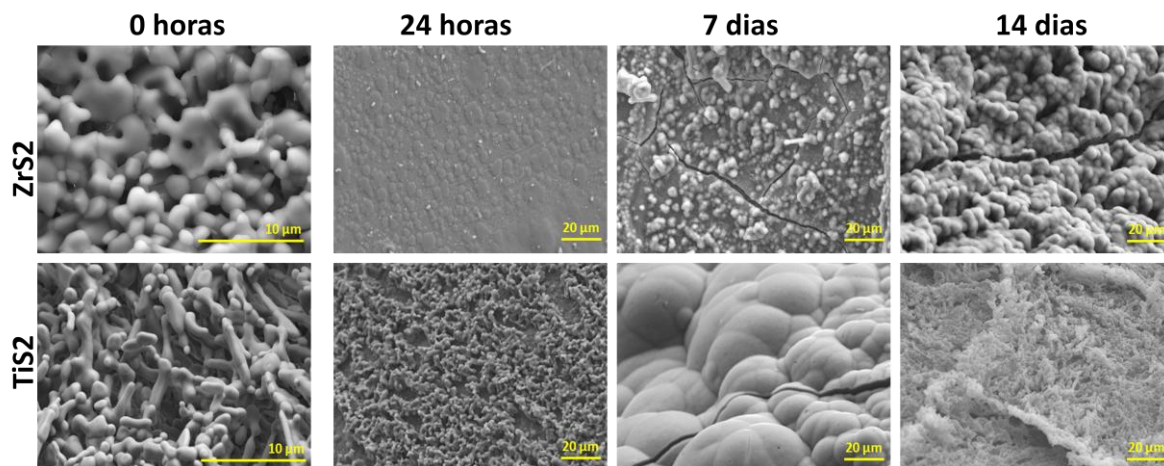


Figura 42 - Micrografias dos *scaffolds* ZrS2 e TiS2 tratados a 700 °C ao fim de diferentes tempos de imersão em SBF.

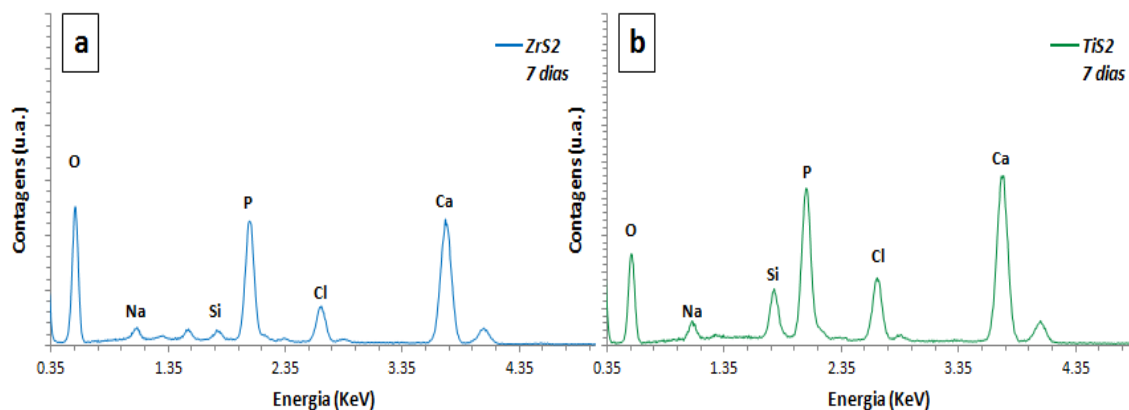


Figura 43 - Gráficos de EDS dos *scaffolds* (a) ZrS2 e (b) TiS2 ao fim de 7 dias de imersão em SBF.

Na figura 44 estão representadas as micrografias dos *scaffolds* com maiores concentrações de PEO, ZrP2 e TiP2 tratadas a 400 °C, ao fim de 24 horas, 7 e 14 dias de imersão em SBF.

Nestes *scaffolds* a deposição da camada apatítica foi mais evidenciada ao fim de 24 horas, para ambos os *scaffolds* com zircónia e com titânia, sendo notório que ao fim de 14 dias a camada depositada é mais fina. Este facto deve-se à provável dissolução dos iões a partir da superfície para o meio. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos na análise ao SBF, através de ICP (figura 50). É de salientar que a estrutura macroporosa dos *scaffolds* com PEO ainda é visível mesmo após deposição da camada apatítica.

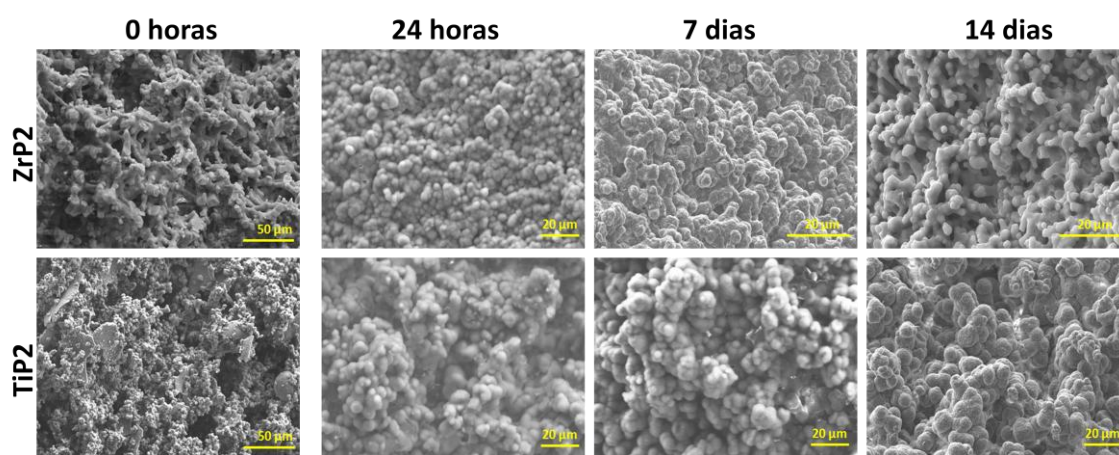


Figura 44 - Micrografias dos *scaffolds* ZrP2 e TiP2 tratados a 400 °C ao fim de diferentes tempos de imersão em SBF.

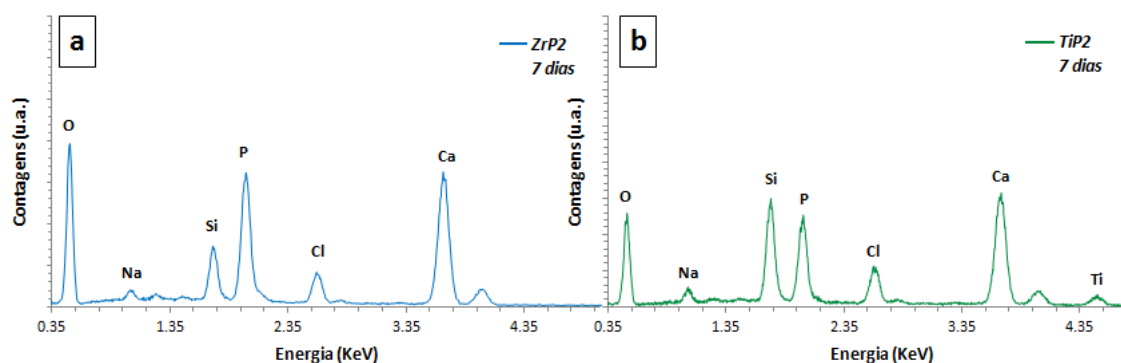


Figura 45 - Gráficos de EDS dos *scaffolds* (a) ZrP2 e (b) TiP2 ao fim de 7 dias de imersão em SBF.

Analisando as micrografias de todas as amostras, bem como os respetivos gráficos de EDS, pode concluir-se que as amostras precursoras induziram a precipitação de uma

camada apatítica maior do que os *scaffolds* com SLS, e que estes depositaram uma camada apatítica maior do que os *scaffolds* com PEO. O facto dos *scaffolds* com PEO apresentarem uma rede macroporosa de maiores dimensões que as restantes amostras pode explicar a formação de uma camada apatítica aparentemente menor.

Na figura 46 está representado o difratograma de raios-X da amostra ZrP2 ao fim de 14 dias de imersão em SBF. Na maioria das amostras não ocorreu a formação de fases cristalinas, mas nas amostras ZrP1, ZrP2, TiP1 e TiP2 (para maiores tempos de imersão), observou-se essa formação. O difratograma apresentado é representativo de todas as amostras em que se formaram fases cristalinas, sendo que os resultados foram os mesmos da amostra ZrP2. O DRX destes *scaffold* mostrou alguns picos indicando a formação de alguns cristais de fosfato de cálcio nas amostras amorfas. Segundo a ficha cristalográfica JCPDS 00-050-0584, estes picos de difração foram indexados à célula unitária monoclinica do tipo fosfato de cálcio ($\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$), devido à identificação dos planos {022}, {222}, {134} e {424}. Estes resultados indicam a cristalização incipiente de cristais de fosfato de cálcio nos *scaffolds* ZrP1, ZrP2, TiP1 e TiP2, para maiores tempos de imersão.

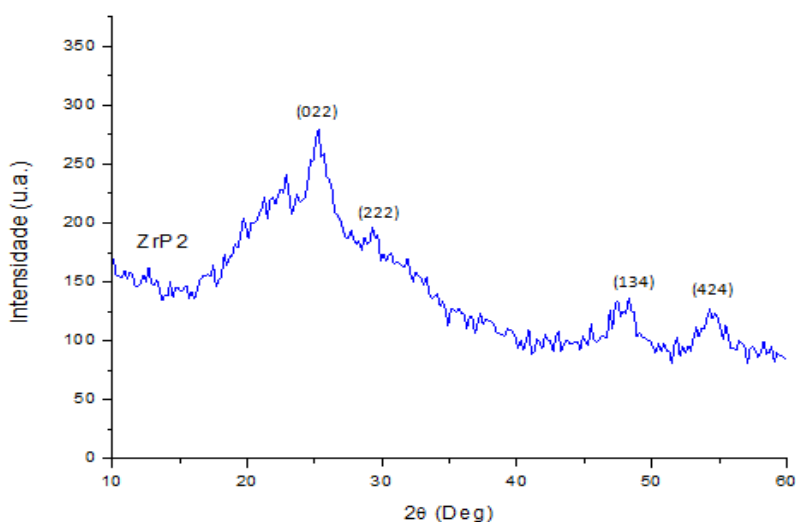


Figura 46 - Difratograma de raio-X d do *scaffold* ZrP2 tratado a 400 °C, após 14 dias de imersão em SBF.

Foram realizados ensaios de FTIR às amostras selecionadas após a imersão em SBF durante 14 dias, mas os mesmos não se revelaram conclusivos. Os espectros obtidos são semelhantes aos espectros de infravermelhos dos materiais de sílica pura, não sendo evidenciada nenhuma banda característica das ligações de fosforo ou cálcio com outros elementos. Na figura 47 está representado o espectro de infravermelhos do *scaffold* ZrP2 tratados a 400 °C, estando descritas na tabela 13 as bandas e respectivas atribuições dos picos representados nos espectros.

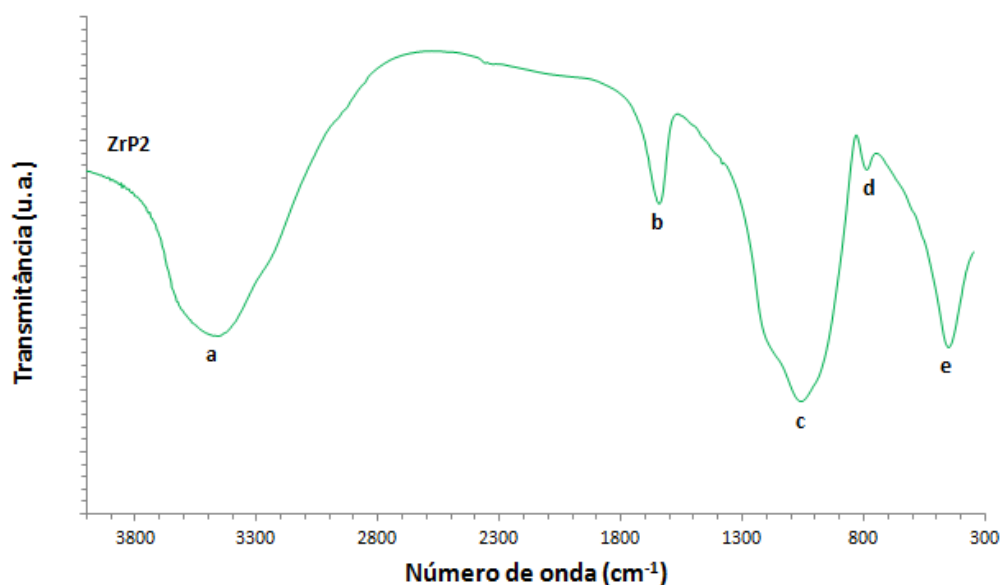


Figura 47 - Espectro de infravermelhos do *scaffolds* ZrP2 tratado a 400 °C, após 14 dias de imersão em SBF.

Tabela 13 - Atribuição das bandas de adsorção do infravermelho correspondente ao *scaffolds* ZrP2 (figura 47), tratado a 400 °C, após 14 dias de imersão em SBF.

<u>Atribuição</u>	Banda	Bandas de Adsorção no Infravermelho (cm⁻¹)
		ZrP2
Alongamento O-H, [85]	a	~3455
Flexão O-H, [83,85]	b	~1643
Alongamento assimétrico Si-O-Si, [108]	c	~1059
Alongamento simétrico Si-O-Si, [108]	d	~789
Flexão Si-O-Si, [109]	e	~453

4.3.2. Análise da variação na concentração iónica da solução

A variação da concentração iónica de Ca e P no SBF analisada por ICP, está representada na figura 48, 49 e 50 para as amostras Zr0 e Ti0, ZrS2 e TiS2, ZrP2 e TiP2, respetivamente. Esta análise foi realizada no SBF onde as amostras selecionadas para os estudos de bioatividade estiveram imersas, nos tempos de 2 horas, 7 horas, 24 horas, 7 dias e 14 dias.

Nas primeiras 2 horas de imersão, evidencia-se um consumo de cálcio e fósforo da solução, em todos os casos, dando a primeira indicação de que se estão a formar precipitados de cálcio e fósforo na superfície dos vidros, como observado nas micrografias de SEM. Verifica-se que em todas as amostras o consumo de cálcio por parte dos espécimes com zircónia é superior ao consumo de cálcio dos espécimes com titânia.

Para as amostras Zr0 e Ti0 (figura 48), observa-se que ao fim de 2 horas de imersão, a concentração de cálcio estabiliza na solução, sendo que ao fim de 7 horas esta concentração aumenta consideravelmente no líquido. Pressupõe-se portanto, que ocorre

uma dissolução dos íons ao mesmo tempo que ocorre a precipitação sobre as amostras, verificando-se uma posterior reprecipitação. Para o caso dos *scaffolds*, tanto com SLS (figura 49) como com PEO (figura 50), a concentração de cálcio na solução após 2 horas de imersão, sofre um aumento relativamente contínuo até aos 14 dias.

Observando os gráficos de ICP correspondentes à variação da concentração de fósforo da solução, é notório que ao fim de 2 horas a concentração de íons de fosforo no SBF estabiliza, sendo relativamente constante na maioria das amostras.

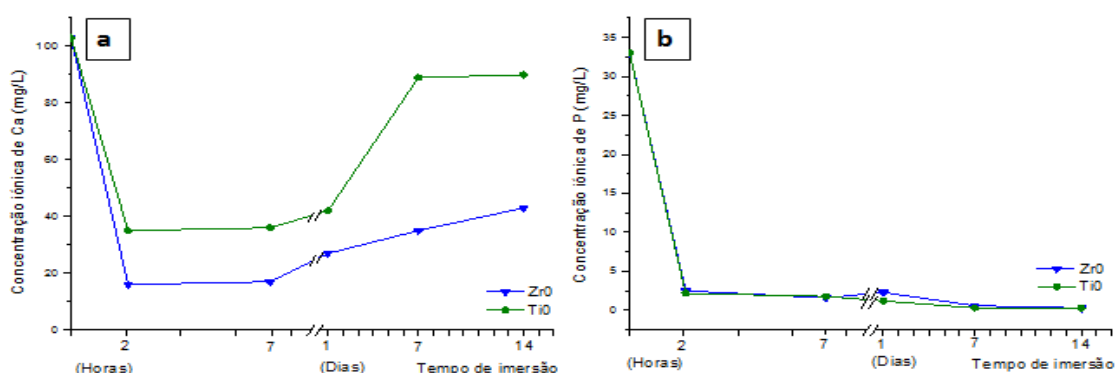


Figura 48 - Concentrações iônicas de (a) Ca e de (b) P em função do tempo de imersão em SBF, das amostras Zr0 e Ti0.

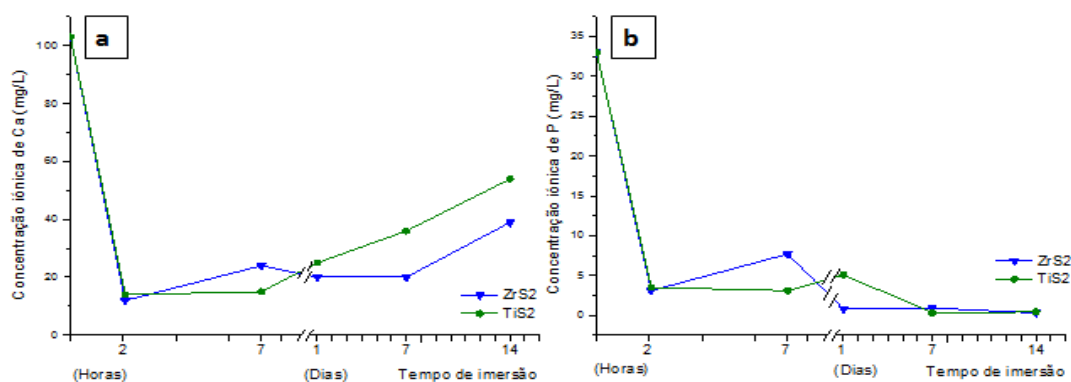


Figura 49 - Concentrações iônicas de (a) Ca e de (b) P em função do tempo de imersão em SBF, dos *scaffolds* ZrS2 e TiS2.

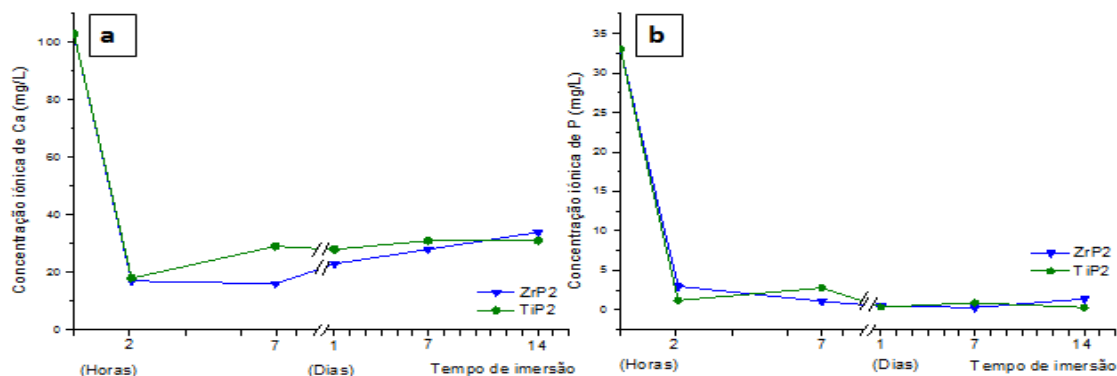


Figura 50 - Concentrações iônicas de (a) Ca e de (b) P em função do tempo de imersão em SBF, dos *scaffolds* ZrP2 e TiP2.

Ao verificar-se que a concentração de fósforo no SBF ao fim de 2 horas é relativamente constante, que a concentração de cálcio no SBF ao fim do mesmo tempo aumenta, e que as amostras não possuem na sua composição fósforo mas possuem cálcio, pode concluir-se que durante a imersão em fluido fisiológico, as amostras estão a sofrer degradação.

Sendo um fenómeno essencialmente de superfície, a bioatividade de um material para além de depender da composição e estrutura do material, é também controlada pela área superficial das amostras testadas. No caso presente, verificou-se que a maior reatividade superficial está associada à menor área superficial, sugerindo que a estrutura dos materiais em análise deve desempenhar um papel importante na taxa de degradação. Em princípio, quanto mais coesa a rede estrutural de um material mais difícil será a sua degradação. Estudos estruturais dos sistemas $58\% \text{SiO}_2 - 23\% \text{CaO} - 9\% \text{ZrO}_2$ e $58\% \text{SiO}_2 - 23\% \text{CaO} - 9\% \text{TiO}_2$ aqui discutidos, seriam importantes para uma melhor compreensão dos mecanismos de bioatividade observados.

Globalmente, os resultados dos ensaios de bioatividade sugerem que os dois tipos de *scaffolds* preparados neste trabalho, têm a capacidade de induzirem a precipitação das camadas apatíticas características dos materiais bioativos, bem como a capacidade de se degradarem a uma taxa relativamente constante. Estas características são consideradas como requisito importante em *scaffolds* para utilização em regeneração óssea [54,58].

Capítulo V

5. Conclusões e trabalhos futuros

No presente trabalho foram produzidos *scaffolds* nos sistemas SiO₂-CaO-ZrO₂ e SiO₂-CaO-TiO₂ pelo método sol-gel, com a introdução de surfactantes (Lauril Sulfato de Sódio, SLS, e Óxido de Polietileno, PEO) como agente formador de poros. Este estudo consistiu nas seguintes etapas: o estudo do efeito do tipo e quantidade de surfactante utilizado nas estruturas produzidas (tratadas a 400 °C e a 700 °C), a influência da adição de ZrO₂ e de TiO₂ nos *scaffolds* obtidos com um dos surfactantes (tratados a 400°C e a 700°C), e a avaliação das características da reatividade superficial.

Os resultados obtidos para a primeira etapa permitiram avaliar a influência do tipo e concentração de surfactantes utilizados na estrutura dos *scaffolds* obtidos, tanto ao nível da mesoporosidade como da macroporosidade.

Os *scaffolds* com SLS, mostraram uma rede de poros interligados com macroporos de tamanhos inferiores a 10 µm, para ambas as concentrações utilizadas, sendo que, o aumento da concentração produziu um aumento das dimensões dos macroporos. Verificou-se que o aumento da concentração de surfactante promoveu ainda o aumento da área superficial específica e consequente diminuição de tamanho de poro. Observou-se ainda que com o aumento da temperatura de tratamento térmico de 400 °C para 700 °C ocorreu um aumento da área superficial devido à queima do surfactante. Conclui-se que o aumento da concentração de SLS melhora significativamente as propriedades da estrutura dos *scaffolds*, e que é necessário recorrer a temperaturas de tratamento térmico suficientemente elevadas para permitir a queima do SLS, promovendo desta forma uma melhor porosidade.

Os *scaffolds* produzidos com PEO mostraram igualmente uma rede de poros interligados, aumentando o tamanho do macroporo com o aumento da concentração do PEO. Observou-se que, para concentrações mais altas de surfactante, o tamanho de macroporo foi consideravelmente maior que nos *scaffolds* de SLS. A introdução do PEO mostrou ainda uma grande influência na mesoporosidade, obtendo-se *scaffolds* com valores de áreas superficiais específicas superiores às dos *scaffolds* produzidos com SLS. O aumento da temperatura de tratamento térmico de 400 °C para 700 °C nestes *scaffolds*, promoveu uma diminuição da área superficial específica devido à densificação. É de salientar que foi possível obter *scaffolds* monolíticos e sem fraturas

com a introdução do PEO como agente formador de poros. Como conclusão deve referir-se que, a utilização do PEO como surfactante permitiu a obtenção de *scaffolds* com uma estrutura macro/mesoporosa com propriedades mais adequadas ao uso destes *scaffolds* como substitutos ósseos regenerativos.

Relativamente à segunda etapa, concluiu-se que, a utilização de sistemas $\text{SiO}_2\text{-CaO-ZrO}_2$ para produzir *scaffolds* com um surfactante permitiu a obtenção de estruturas com valores de áreas superficiais significativamente maiores, comparando com as estruturas obtidas a partir dos sistemas $\text{SiO}_2\text{-CaO-TiO}_2$. Este resultado deve-se ao facto da gelificação das estruturas com zircónia ocorrer em tempos mais curtos, visto o propóxido de zircónio ser um alcóxido metálico mais reativo que o isopropóxido de titânio.

Na avaliação das características da reatividade superficial, verificou-se que todos os *scaffolds* apresentam a capacidade de depositar, na sua superfície, uma camada apatítica típica dos materiais bioativos. Os *scaffolds* produzidos com PEO apresentaram a deposição de uma camada apatítica aparentemente menor do que os *scaffolds* com SLS. Este facto deve-se possivelmente à rede de macroporos de maiores dimensões nos *scaffolds* com PEO, comparando com a rede de macroporos nos *scaffolds* com SLS. Em todos os *scaffolds* observa-se que os sistemas com zircónia proporcionam a formação de uma camada apatítica mais evidente comparando com os sistemas com titânia, o que pode estar relacionado com os valores de área superficial específica superiores.

Conclui-se assim que a área superficial é um parâmetro importante na bioatividade, sendo que a composição e estrutura dos *scaffolds* desempenham também um papel fundamental. Todos os *scaffolds*, para além de serem bioativos, apresentaram taxas de degradação relativamente constantes, exibindo deste modo, alguns dos requisitos dos *scaffolds* para utilização em regeneração óssea.

Globalmente, os resultados obtidos permitem concluir que, os *scaffolds* produzidos nos sistemas $\text{SiO}_2\text{-CaO-ZrO}_2$ e $\text{SiO}_2\text{-CaO-TiO}_2$ pelo método sol-gel, utilizando o PEO como agente formador de poros, apresentam potencialidades que justificam a continuação das pesquisas.

Trabalhos futuros

Os resultados obtidos no presente trabalho revelaram a necessidade de novos estudos, sendo sugerido como trabalhos futuros:

- O estudo de uma gama mais variada de concentrações de surfactantes não iônicos, utilizados como agente formador de poros, para produzir *scaffolds* nos sistemas $\text{SiO}_2\text{-CaO-ZrO}_2$ e $\text{SiO}_2\text{-CaO-TiO}_2$ pelo método sol-gel.
- O estudo de menores temperaturas de tratamentos térmicos nos *scaffolds* produzidos, a fim de obter uma porosidade mais adequada para aplicações em regeneração óssea.
- A realização de ensaios mecânicos, a fim de analisar a resistência á compressão dos *scaffolds* produzidos.
- A realização de ensaios de bioatividade e biocompatibilidade em meio celular.

Bibliografia

- [1] D. Arcos, M. Vallet-Regi, “Sol-gel sílica-based biomaterials and bone tissue regeneration”, *Acta Biomaterialia*, vol.6, pp. 2874-2888, 2010.
- [2] Q. Fu, E. Saiz, M. N. Rahaman, A. P. Tomsia, “Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of art and future perspectives”, *Materials Science and Engineering*, vol.31, pp. 1245-1256, 2011
- [3] J. R. Jones, “New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure”, *Journal of the European Ceramic Society*, vol.29, pp. 1275-1281, 2009.
- [4] Qi-Zhi Chen, G. A. Thouas, “Fabrication and characterization of sol-gel derived 45S5 Bioglass-ceramic scaffolds”, *Acta Biomaterialia*, vol.7, pp. 3616–3626, 2011.
- [5] J. R. Jones, O. Tsigkou, E. E. Coates, M. M. Stevens, J. M. Polak , L. L. Hench, “Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells“, *Biomaterials*, vol.28, pp. 1653–1663, 2007.
- [6] J. R. Jones, L. M. Ehrenfried, L. L. Hench, “Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering”, *Biomaterials*, vol.27, pp. 964–973, 2006.
- [7] C. Shu, Z. Wenjuan, G. Xu , Z. Wei, J. Wei, W. Dongmei, “Dissolution behavior and bioactivity study of glass ceramic scaffolds in the system of CaO–P₂O₅–Na₂O–ZnO prepared by sol-gel technique”, *Materials Science and Engineering*, vol.30, pp. 105–111, 2010.
- [8] R.G.R. Avendaño, J.A. De Los Reyes, T. Viveros, J.A.M. De La Fuente, “Synthesis and characterization of mesoporous materials: silica-zirconia and silica-titania.”, *Catalysis Today*, vol.148, pp. 12-18, 2009.

- [9] I. Hasegawa, K. Hibino, K. Takei, "Building Block Approach to SiO₂-ZrO₂ Porous Materials", *Appl. Organometal. Chem.*, vol.13, pp.549–554, 1999.
- [10] Y. Kanno, "Discussion on the double oxides formation in the systems of ZrO₂-SiO₂, ZrO₂-TiO₂ and TiO₂-SiO₂.", *Journal of materials science letters*, vol.9, pp. 765-767, 1990.
- [11] R.G.R. Avendaño, J.A. De Los Reyes, J.A. Montoya, T. Viveros, "Preparation And characterization of mesoporous Titanium-silica and zirconia-silica mixed osides", *Superficies y vacío*, vol.19, pp. 1-6, 2006.
- [12] R.M. Almeida, A. Gama, Y. Vueva, "Bioactive sol-gel scaffolds with dual porosity for tissue engineering", *Journal Sol-Gel Sci Technol*, vol.57 pp. 336-242, 2011.
- [13] R.A.M. Fontes, "Fabrico e caracterização de scaffolds à base de fosfato de cálcio", Tese de Mestrado no *Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Técnica de Lisboa*, 2011.
- [14] A. J. Salgado, O.P. Coutinho, R.L. Reis, "Bone tissue engineering: state of the art and future trends", *Macromol. Biosci.*, vol.4, pp. 743-756, 2004.
- [15] R.A. Martin, S. Yue, J.V. Hanna, P.D. Lee, R.J. Newport, M.E. Smith, J.R. Jones, "Characterizing the hierarchial structures of bioactive sol-gel silicate glass and hybrid scaffolds for bone regeneration", *Phil. Trans. R. Soc. A*, pp. 1422-1443, 2012.
- [16] L.S.O. Pires., "Biocerâmicos e Biovidros para prototipagem 3D: propriedades e formulações", Tese de Mestrado no *Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Universidade de Aveiro*, 2011.
- [17] J.A. McAuliffe, " Bone Graft Substitutes", *Journal of Hand Therapy*, vol.16, pp. 180-87, 2003.

- [18] A. Torroni, “Engineered Bone Grafts and Bone Flaps for Maxillofacial Defects: State of the Art”, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol.67, pp. 1121-27, 2009.
- [19] Bone grafts and bone substitutes, *Orthopedic Network NewsMendenhall Associates, Inc.*, pp. 10-17, 1999.
- [20] M. Gutierrez, M. A. Lopes, N. S. Hussaintt, A.T. Cabral, L. Almeida, J. D. Santos, “Substitutos ósseos: Conceitos gerais e estado atual”, *Arquivos de Medicina*, vol.19, pp. 153-162, 2006.
- [21] P.X. Ma, “Scaffolds for tissue fabrication”, *Materials Today*, pp. 30-40, 2004.
- [22] T. Cordonnier, J. Sohier, P. Rosset, P. Layrolle, “Biomimetic Materials for bone tissue engineering – State of the art and future trends”, *Advanced Engineering Materials*, vol.13, No.5, pp.130-150, 2011.
- [23] M. Schieker, H. Seitz, I. Drosse, S. Seitz., W. Mutschler, “Biomaterials as Scaffolds for bone tissue engineering”, *European Journal of Trauma*, vol.24, pp. 32-114, 2006.
- [24] M. Spector, “Principles and practice Tissue Engineering: I. A. Introduction/background.”, *Massachusetts Institute of Technology*, 2007.
- [25] T.D. Szűcs, “Production of Hard Tissue Scaffolds Using Three-Dimensional Printing Method.”, *Dublin, Dublin city University*, 2008.
- [26] S. C. P. Cachinho, “Titânio macroporoso para osteointegração- replicação inversa de esponjas poliméricas”, Tese de Mestrado no *Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Universidade de Aveiro*, 2006.
- [27] A. Nather, H. Ong, and Z. Aziz,” Bone grafts and Bone substitutes”, *World Scientific Publishing Company*, 2005.

- [28] V.I. Sikavitsas, J.S. Temenoff, A.G. Mikos, "Biomaterials and bone mechanotransduction", *Biomaterials*, vol.22, pp. 2581-2593, 2011.
- [29] A. Butscher, M. Böhner, S. Hofmann, et al., "Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing.", *Acta Biomaterialia*, vol.7, pp. 907-920, 2011.
- [30] M. N. Rahaman, D. E. Day, B.S. Bal, Q. Fu, S. B. Jung, L. F. Bonewald., A.P. Tomsia, "Bioactive glass in tissue engineering", *Acta Biomaterialia*, vol.7, pp. 2355-2375, 2011.
- [31] J.R. Jones, P.D. Lee, L.L. Hench, "Hierarchical porous materials for tissue engineering", *Phil. Trans. R. Soc.*, pp.263-281, 2006.
- [32] M.H.R. Fernandes, "Mecanismos de Regulação do Metabolismo Ósseo", *Acta Médica Portuguesa*, vol.11, pp. 41-52, 1998.
- [33] Y. Gao, et al." Characterization and osteoblast-like cell compatibility of porous scaffolds: bovine hydroxyapatite and novel hydroxyapatite artificial bone", *Journal Mater Sci Mater Med*, vol.17, pp. 815-823, 2006.
- [34] G. Goller, "Effect of sintering temperature on mechanical and microstructural properties of bovine hydroxyapatite (BHA)", *Journal Sol-Gel Sci Techn*, vol.37, pp. 111-115, 2006.
- [35] J. Wagoner, B.A. Herschler, et al., " A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair." *Acta Biomater*, vol.7, pp.16-30, 2011.

- [36] M.J.R. Coelho, “Modulação farmacológica da interacção tecido ósseo/biomateriais. Estudos in vitro.”, Tese de Doutoramento da *Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto*, 2001.
- [37] J. Salo , “Bone resorbing osteoclasts reveal two basal plasma membrane domains and transcytosis of degraded matrix material”, *Department of Anatomy and Cell Biology, and Biocenter Oulu, University of Oulu*, 2002.
- [38] C. Liu, J. Xia, J.T. Czernuszka, “Design and Development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering.”, *Chemical Engineering Research and Design*, vol.85, pp. 1051-1064, 2007.
- [39] D.W. Hutmacher, “Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage.”, *Biomaterials*, vol.21, pp. 2529-2543, 2000.
- [40] B. Subia, J. Kundu, S.C. Kundu, “Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications”, *Tissue Engineering*, pp.141-158, 2010.
- [41] Y. Shoufeng, D. Zhaohui, C. Chee-Kai, “The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional Factors.”, *Tissue Engineering*, vol.7, pp.679-689, 2011.
- [42] C.V. Brovarone, E. Vérne, P. Appendino, “Macroporous bioactive glass-ceramic scaffolds for tissue engineering”, *Journal Mater Sci*, vol.17, pp.1069-1078, 2006.
- [43] A.G. Karlis, M.R.L. Luis, “Biodegradable composite scaffolds with an interconnected spherical network for bone tissue engineering”, *Biomaterials*, vol.25, Pp.4955-4962, 2004.

- [44] J. Black, “Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility”, *Marcel Dekker, Inc.*, Second edition, 1992.
- [45] A.M.B. Silva, “ Reactividade superficial de vidros com TiO₂ em soluções fisiológicas.”, Tese de mestrado do *Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Universidade de Aveiro*, 2008.
- [46] H.Y. Cheung, K.-T. Lau, T.-P. Lu, D. Hui, “A critical review on polymerbased bioengineered materials for scaffold development”, *Composites: Part B*, vol.38, pp.291-300, 2007.
- [47] R.A.J.R. Felicity, O.C.O. Richard, “Breakthroughs and views Bone tissue engineering: Hope vs Hype”, *Biochemical and biophysical Research Communications*, vol.292, pp.1-7, 2002.
- [48] J.L.B. Karen, P. Scott, F.K. James, “Biomaterial developments for bone issue enginnering”, *Biomaterials*, vol.21, pp.2347-2359. 2000.
- [49] N.B. Barroca, “Scaffolds à base de polímeros piezoelétricos para regeneração óssea”, Tese de mestrado do *Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Universidade de Aveiro*, 2008.
- [50] K.F. Leong, C.M. Cheah, C.K. Chua, “Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs”, *Biomaterials*, vol.24, pp. 2363-78, 2003.
- [51] J. Marshall, “ Personal Prototyping: Ceramics-based 3D inkjet and laser printing technology offers customized tissue engineering, body parts and more.”, *American Ceramic Society Bulletin*, vol.88, pp. 19-25, 2009.

- [52] F. Gerald, F.M. Wilhelm, “Amorphous porous mixed oxides: sol-gel ways to a highly versatile class of materials and catalysts.”, *Annu. Rev. Mater. Res.*, vol.36, pp. 281-331, 2006.
- [53] L.A. Santos, “Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica”, Dissertação de Doutorado, *Universidade Estadual de Campinas*, 2002.
- [54] W. Cao, L.L. Hench, “Biactive materials.”, *Ceramics International*, vol.22, pp. 493-507, 1996.
- [55] S.H. Li, J.R. Wijn, P. Layrolle, K. Groot, “Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering.”, *J. Biomed. Mat. Res.*, vol.61, pp. 109-120, 2002.
- [56] H.P. Yuan, Z.M. Yang, Y. Li, X.D. Zhang, J.D. Bruijn, K. Groot, “Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials.”, *J. Mat Sci.-Mat. Med.*, vol.9, pp.723-726, 1998.
- [57] J.V.A. Junior., “Compósitos polímero/fosfato de cálcio para aplicações biomédicas”, Tese de mestrado do *Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro*, *Universidade de Aveiro*, 2005.
- [58] H.A. Yuehuei, K.W. Shane, J.F. Richard, “Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic device bioabsorbable devices”, *Biomaterials*, vol.21, pp. 2635-2652, 2000.
- [59] G. Zigang, J. Zhaoxia, C. Tong, “Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration”, *Biomedical Materials*, vol.3, pp. 1088-1748, 2008.
- [60] L.L. Hench, “Bioceramics”, *Journal of American Ceramic Society*, vol.81, pp.1705-1728, 1998.

- [61] L.L. Hench, "Ceramics, Glasses and Glass-Ceramics." *In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, editors. Biomaterials science – An Introduction to materials in medicine, London: academic press, 1996.*
- [62] V.R. Maria, "Ceramics for medical applications", *Journal Chem. Soc., Dalton Trans.*, pp. 97-108, 2001.
- [63] J. R. Jones, "Review of bioactive glass: From Hench to hybrids", *Acta Biomaterialia*, 2012.
- [64] I.D. Xynos, M.V.J. Hukkanem, J.J. Batten, L.D. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, "Bioglass®45S5 Stimulates Osteoblast Turnover and Enhances Bone Formation *In Vitro*: Implications and Applications for Bone Tissue Engineering.", *Calcified Tissue International*, vol.67, pp. 321-329, 2000.
- [65] C. M.G.A. Queiroz, "Cristalização de Biomateriais Vitrocerâmicos e Mineralização em Meio Fisiológico Simulado", Tese de mestrado do *Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Universidade de Aveiro*, 2005.
- [66] J. R. Jones, L.L. Hench, "Large-scale production of 3D bioactive glass macroporous scaffolds for tissue engineering", *J. Sol-Gel Sci Techn*, vol.29, pp 179-188, 2004.
- [67] I.M.M. Salvado, "Preparação pelo Processo Sol-Gel e Caracterização de materiais dos sistemas $\text{SiO}_2\text{-ZrO}_2$, $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ e $\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$. Aplicação como revestimentos protetores.", Tese de Doutoramento do *Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Universidade de Aveiro*, 1990.
- [68] C.J. Brinker, G.W. Scherer, "The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing", *Academic Press, Inc*, 1990.

- [69] Y.T. Nataliva, P.T. Evgeniya, G.K. Vadim, I.Y. Maria, "The Chemistry of Metal Alkoxides", *Kluwer Academic Publishers*, 2002.
- [70] D.M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen, "Titanium in medicine", *Springer*, pp. 269-272, 2001.
- [71] N.M. José, L.A.S.A. Prado, "Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações", *Química Nova*, vol.28, pp. 281-288, 2005.
- [72] W.Q. Yan, T. Nakamura, M. Kobayashi, H.M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, "Bonding of chemically treated titanium implants to bone", *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol.37, pp. 267-275, 1997.
- [73] R. Rohanizadeh, W.A. Al-Fraih, M. Harsono, R.Z. LeGeros, "Chemical modification of titanium surface: Effect on apatite deposition", *Key Engineering Materials*, pp. 461-464, 2003.
- [74] L.C.O. Vercik, C.M. Assis, M.V.L. Fook, M. L. Santos, A.C. Guastaldi, "Recobrimento de apatitas in vitro sobre titânio: Influência do tratamento térmico", *Eclética Química*, vol.28, pp. 25-31, 2003.
- [75] C. Qi, M. Noboru, K. Tadashi, N. Takashi, N., "Bioactivity and mechanical properties of PDMS-modified CaO-SiO₂-TiO₂ hybrids prepared by sol-gel process", *Department of Material Chemistry, Faculty of Engineering, Kyoto University, Yoshida-Honmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan*, 2000.
- [76] M. Wei, M. Uchida, H.M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura, "Apatite-forming ability of CaO-containing titania", *Biomaterials*, vol.23, pp. 167-172, 2002.
- [77] A.G. Dias, I.R. Gibson, J.D. Santos, M.A. Lopes, "Physicochemical degradation studies of calcium phosphate glass ceramic in the CaO-P₂O₅-MgO-TiO₂ system", *Acta Biomaterialia*, vol.3, pp. 263-269, 2007.

- [78] J.L. Vivero-Escoto, Y.D. Chiang, K.C.W. Wu, Y. Yamauchi, "Recent progress in mesoporous titania materials: adjusting morphology for innovative application", *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol.13, pp. 1-9, 2012.
- [79] J. Navarrete, T. Lopez, R. Gomez, "Surface Acidity of Sulfated $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ Sol-Gel", *Langmuir*, vol.12, pp. 4385-4390, 1996.
- [80] Y. Castro, M. Aparicio, R. Moreno, A. Durán, "Silica-Zirconia Sol-Gel Coatings Obtained by Different Synthesis Routes", *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol.35, pp. 41-50, 2005.
- [81] Y. Zhu, Y. Zhang, C. Wu, Y. Frang, J. Yang, S. Wang, "The effect of zirconium incorporation on the physiochemical and biological properties of mesoporous bioactive glasses scaffolds", *Microporous and Mesoporous Materials*, vol.143, pp.311-319, 2011.
- [82] A.A.S. Alfaya, Y. Gushikem, S.C. Castro, "Silica-Zirconia-phosphate composites: a study of their synthesis, proton exchange capacity and ammonia gas adsorption", *Microporous and Mesoporous Materials*, vol.39, pp. 57-65, 2000.
- [83] T. Lopez, F. Tzompantzi, J. Hernández-Ventura, R. Gómez, "Effect of Zirconia Precursor on the Properties of $\text{ZrO}_2\text{-SiO}_2$ Sol-Gel Oxides", *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol.24, pp. 207-219, 2002.
- [84] J.J.H. Lancastre, F.M.A. Margaça, L.M. Ferreira, A.N. Falcão, I.M.M. Salvado, M.S.M.S. Nabiça, M.H.V. Fernandes, "Thermal analysis and SANS characterization of hybrid materials of biomedical applications", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol.109, pp. 413-418, 2012.
- [85] M.M.P. Marques, I.M.M. Salvado, M.F.M.A. Margaça, L.M. Ferreira, "The role of Zirconium as thermal stabilizer of PDMS-TEOS hybrids", *Journal Therm Anal Calorim*, vol.100, pp. 557-561, 2010.

- [86] C.R.E. Mansur, G. González, F.F. Lucas, “Estudo de Soluções Aquosas de Copolímeros em Bloco de Poli(Óxido de Etileno)-Poli(Óxido de Propileno) Utilizando Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)”, *Polímeros: Ciência e tecnologia, Instituto de Macromoléculas, Universidade Federal do Rio de Janeiro*, pp.45-53, 1999.
- [87] R.F.G.P.F. Pereira, “Interações entre íons metálicos e surfactantes aniônicos”, Tese de Doutorado de *Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra*, 2011.
- [88] E. Minatti, “Interação entre Polímeros e Surfactantes”, Tese de Doutorado do *Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina*, 1999.
- [89] J.Y. Ying, C.P. Mehnert, M.S. Wong, “Synthesis and applications of supramolecular-templated mesoporous materials”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol.38, pp. 56-77, 1999.
- [90] P.B.A. Costa, “Síntese e propriedades de surfactantes di-aniônicos”, Tese de Mestrado do *Departamento de Química, Universidade de Coimbra*, 2011.
- [91] C.G.F.T. Rossi, T.N.C. Dantas, A.A.D. Neto, M.A.M. Maciel, “Tensioativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial”, *Rev. Univ. Rural. Sér. Ci. Exatas e da Terra*, pp. 59-71, 2005.
- [92] M.B. Coelho, M.M. Pereira, “Sol-gel synthesis of bioactive glass scaffolds for tissue engineering: effect of surfactant type and concentration”, *Wiley Periodical Inc.*, pp. 451-456, 2005.
- [93] J.R. Jones, L.L. Hench, “Effect of surfactant concentration and composition on the structure and properties of sol-gel-derived bioactive glass foam scaffolds for tissue engineering”, *Journal of Materials Science*, vol.38, pp. 3783-3790, 2003.

- [94] S.M. Herman, S. C. Hermes, “Nanostructured poly(vinyl alcohol)/bioactive glass and poly(vinyl alcohol)/chitosan/bioactive glass hybrid scaffolds for biomedical applications”, *Chemical Engineering Journal*, vol.137, pp. 72-83, 2008.
- [95] T. Yokoi, H. Yoshitake, T. Tatsumi, “Synthesis of anionic-surfactant-templated mesoporous silica using organoalkoxysilane-containing amino groups”, *Chem. Mater.*, vol.15, pp. 4536-4538, 2003.
- [96] M.M.S. Silva, “Compósitos de sais de lítio com Polietilenod-B-Óxido de Polietileno: Fundamentos e Aplicações”, Tese de Mestrado de *Universidade Federal do Vale do São Francisco*, 2011.
- [97] P.C. Lombardo, “Fotooxidação do Compósito Poli (óxido de etileno)/Montmorilonita. Influência da Argila e de Fotoestabilizantes”, Tese de Mestrado de *Universidade de São Paulo*, 2012.
- [98] J.L. Blin, A. Léonard, Z.Y. Yuan, L. Gigot, A. Vantomme, A.K. Cheetham, B.L. Su, “Hierarchically Mesoporous/Macroporous Metal Oxides Templated from Polyethylene Oxide Surfactant Assemblies”, *Angew. Chem.*, vol.115, pp. 2978-2981, 2003.
- [99] A.C. Marques, H. Jain, C. Kiely, K. Song, C.J. Kiely, R.M. Almeida, “Nano/macroporous monolithic scaffolds prepared by the sol-gel method”, *Journal Sol-Gel Science and technology*, vol.51, pp. 42-47, 2009.
- [100] A.C. Marques, A. Thiema, S. Wang, M.M. Falk, H. Jain, “Sol-Gel-derived glass scaffolds with high pore interconnectivity and enhanced bioactivity”, *Journal Mater. Res.*, vol.24, pp. 3495-3502, 2009.
- [101] R.M. Almeida, A. Gama, Y. Vueva, “Bioactive sol-gel scaffolds with dual porosity for tissue engineering”, *Journal Sol-Gel Sci. Technol.*, vol.57, pp. 336-342, 2011.

- [102] K. Zimny, T. Roques-Carnes, C. Carteret, M.J. Stébé, J.L. Blin, "Synthesis and photoactivity of ordered mesoporous titania with a semicrystalline framework", *Journal Phys. Chem.*, vol.116, pp. 6585-6594, 2012.
- [103] K.S.W. Sing, D.H. Everett, R.A.W. Haul, L. Moscou, R.A. Pierotti, J. Rouquérol, T. Siemieniewska, "Reporting Physisorption Data For Gas/Solid Systems," *Pure & Appl. Chem.*, vol. 57, n.º 4, pp. 603-619, 1984.
- [104] J. Ren, S. Liu, Y. Xing, "Silica-titania mixed oxides: Si-O-Ti connectivity, coordination of titanium, and surface acidic properties", *Catal Lett*, vol.124, pp. 185-194, 2008.
- [105] Y.Y. Ma, P.N. Jia, X.C. Li, "Synthesis of the ZrO₂-SiO₂ microspheres as a mesoporous candidate material", *Journal Porous Material*, vol.19, pp: 1047-1052, 2012.
- [106] I.V. Krivtsov, M.V. Ilkaeva, V.V. Avdin, D.A. Zhrebtssov, "Properties and segregation stability of the composite silica-zirconia xerogels prepared via "acidic" and "basic" precipitation routes", *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol.362, pp. 95-100, 2013.
- [107] M. Catauro, G. Laudisio, A. Costantini, R. Fresa, F. Branda, "Low Temperature Synthesis, Structure and Bioactivity of 2CaO/3SiO₂ Glass", *Journal Sol-Gel Sci Techn*, vol.10, pp.231-237, 1997.
- [108] H. Yoshino, K. Kamiya, H. Nasu, "IR study on the structural evolution of sol-gel derived SiO₂ gels in the early stage of conversion to glass", *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol.126, pp. 68-78, 1990.
- [109] H. Aguiar, J. Serra, P. González, B. León, B., "Structural study of sol-gel silicate glass by IR and Raman spectroscopies", *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol.355, pp. 475-480, 2009.

- [110] H. Pu, L. Zhang, D. Du, C. Han, H. Li, J. Li, Y. Luo, "One-step synthesis of mesoporous zirconia nanoparticles with anionic template", *Korean Journal Chem. Eng.*, vol.29, pp. 1285-1288, 2012.
- [111] Z.O. Siagi, M. Mbarawa, A.R. Mohamed, K.T. Lee, I. Dahlan, I., "Removal of sulphur dioxide by calcium-based materials from different sources in South Africa", *Asia-Pacific International Symposium on Combustion and Energy Utilization*, 2006.
- [112] H.D. Wu, S.Y. Lee, M. Poma, J.Y. Wu, D.C. Wang, J.C. Yang, "A novel resorbable α -calcium sulfate hemihydrate/amorphous calcium phosphate bone substitute for dental implantation surgery", *Material Science and Engineering*, vol. 32, pp. 440-446, 2012.
- [113] K. Jimmy, C. Carteret, M.J. Stébé, J.L. Blin, "Multitechnique investigation of mesoporous titanasilicate materials prepared from both the self-assembly and the liquid crystal mechanisms", *Journal Phys. Chem.*, vol.115, pp.8684-8692, 2011.
- [114] A. Pirson, P. Mohsine, P. Marchot, B. Michaux, O.V. Cantfort, J.P. Pirerd, "Synthesis of SiO_2 - TiO_2 xerogels by Sol-Gel process", *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol.4, pp. 179-184, 1995.
- [115] Z.Y. Yuan, T.Z. Ren, A. Vantomme, B.L. Su, "Facile and generalized preparation of hierarchically mesoporous-macroporous binary metal oxide materials", *American Chemical Society*, vol.16, pp. 5096-5106, 2004.
- [116] R. Zhang, A.A. Elzatahry, S.S. Al-Deyad, D. Zhao, "Mesoporous titania: from synthesis to application", *Nano Today*, vol.7, pp.344-366, 2012.